

# Immobilisierung von Enzymen für die multienzymatische Synthese von Laminaribiose

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Clarissa Brigitte Müller

aus Mutlangen

1. Referent:	apl. Professor Dr. Hans-Joachim Jördening
2. Referent:	Professor Dr. Adrian Schumpe
eingereicht am:	31.07.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	04.12.2017

Druckjahr 2018

# Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

C. Müller, T. Ortmann, A. Abi, D. Hartig, S. Scholl, H.-J. Jördening, Immobilization and Characterization of *E. gracilis* Extract with Enriched Laminaribiose Phosphorylase Activity for Biocatalytic Production of Laminaribiose, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2016) 1–19. doi:10.1007/s12010-016-2320-4.

C. Müller, D. Hartig, K. Vorländer, A.-C. Sass, S. Scholl, H.-J. Jördening, Chitosan-based hybrid immobilization in biocatalytic reactions and its application to the production of laminaribiose, *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2017). doi:10.1007/s00449-017-1797-8.

## Tagungsbeiträge

C. Müller, T. Ortmann, S. Scholl, H.J. Jördening: Process Evaluation for a Trienzymatic System, (Vortrag) 18th International Conference on Biocatalysis, Barcelona (2016).

# Danksagung

Bei der Arbeit an dem Projekt „Integration von Reaktion und Produktabtrennung für trienzymatisch katalysierte Synthesen hochwertiger Oligosaccharide aus Saccharose“ und dem Verfassen der vorliegenden Arbeit habe ich viele neue wissenschaftliche und persönliche Erfahrungen, Einsichten und Kenntnisse gewonnen, für die ich dankbar bin.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jördening, bei dem ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig war, während ich diese Arbeit anfertigte. Ich danke ihm für die wissenschaftliche Unterstützung, die großen Freiheiten sowie die Hilfestellungen bei fachlichen Fragen. Herrn Prof. Dr. Schumpe danke ich für die Übernahme des zweiten Referats. Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Rau für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die damit verbundene administrative Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit und viele interessante Diskussionen. Weiterhin möchte ich allen an diesem Projekt beteiligten Studenten danken, die durch ihre Mitarbeit und Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an Herrn Hartig für seine stete Bereitschaft Fragen zu beantworten, Probleme zu diskutieren und die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit.

Für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre in der Abteilung Technologie der Kohlenhydrate bedanke ich mich bei allen Mitgliedern.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums und darüber hinaus, die mich durch alle Hochs und Tiefs des Entstehungsprozesses begleitet hat.

# Inhaltsverzeichnis

Symbol und Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung.....	3
2 Zielsetzung.....	4
3 Theorie.....	6
3.1 Immobilisierung.....	7
3.1.1 Immobilisierung über Trägerbindung.....	8
3.1.1.1 Immobilisierung über Adsorption .....	9
3.1.1.2 Immobilisierung über kovalente Bindung .....	9
3.1.1.2.1 Epoxy-Träger .....	10
3.1.1.2.2 Aldehyd-Träger.....	11
3.1.2 Einschluss.....	12
3.1.3 Quervernetzung ( <i>Crosslinking</i> ) .....	13
3.1.4 Gemischte Methoden.....	15
3.1.5 Multienzymimmobilisierung.....	15
3.2 Prozessgestaltung/Prozessführung .....	15
3.2.1 Reaktorauswahl .....	15
3.2.2 Prozessführung/Betriebsart .....	16
3.2.3 ISPR .....	17
3.2.4 Multienzymatische Prozesse .....	17
3.3 Werkzeuge für die Prozessentwicklung .....	19
3.3.1 Statistische Versuchsplanung.....	19
3.3.2 Mathematische Modelle: Kinetik, Modellierung und Simulation .....	21
3.3.2.1 Kinetik.....	21
3.3.2.1.1 Enzymkinetik nach Michaelis-Menten .....	22
3.3.2.1.2 Enzyminhibitoren .....	22
3.3.2.1.3 Mehrsubstratreaktionen .....	23
3.4 Eingesetzte Enzyme.....	25
3.4.1 Sucrosephosphorylase.....	25
3.4.2 Laminaribiosephosphorylase.....	26
3.4.3 Glucoseisomerase.....	27
4 Material und Methoden .....	28
4.1 Material .....	28
4.2 Methoden.....	29

4.2.1	Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i> .....	29
4.2.2	Aufkonzentrierung von Laminaribiosephosphorylase .....	30
4.2.3	Bestimmung der Enzymaktivität (Aktivitätstest) .....	31
4.2.4	Zuckeranalytik .....	31
4.2.4.1	High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC) .....	31
4.2.4.2	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) .....	32
4.2.5	Immobilisierungsmethoden .....	32
4.2.5.1	Crosslinking mit Dextranaldehyd und Glutardialdehyd .....	32
4.2.5.2	Adsorption an Bentonit .....	32
4.2.5.3	Einschluss von nativem Enzym in Chitosan .....	33
4.2.5.4	Einschluss von nativem Enzym in 2 % Agar .....	33
4.2.5.5	Kovalente Immobilisierung auf Eupergit C und Sepabeads EC-EP/S .....	33
4.2.6	Trienzymatisches System als Vorversuch zur Immobilisierung auf Sepabeads .....	33
4.2.7	Optimierung der Immobilisierung von Laminaribiosephosphorylase auf Sepabeads ..	34
4.2.8	Charakterisierung der Enzyme auf Sepabeads .....	34
4.2.9	Festlegung trienzymatischer Bedingungen .....	35
4.2.10	Versuch zur Anwendbarkeit trienzymatischer Bedingungen .....	35
4.2.11	Versuch zur bienzymatischen Produktion von Laminaribiose mit Glucose als Cosubstrat	36
4.2.12	Stabilität und Wiederverwendbarkeit von LP und SP (Sepabeads und native LP) .....	36
4.2.13	Bestimmung der kinetischen Parameter von SP- und LP-Sepabeads .....	36
4.2.14	Lagerung von LP-Sepabeads .....	37
4.2.15	Einschluss von (LP-)Sepabeads in Agar und Agarose .....	37
4.2.16	Optimierung des Feststoffgehaltes beim Einschluss von LP-Sepabeads in Chitosan ....	38
4.2.17	Charakterisierung der LP-Hybridimmobilisate .....	38
4.2.18	Nachweis der Anwendbarkeit bienzymatischer Bedingungen (Hybridimmobilisate) ...	39
4.2.19	Stabilität, Wiederverwendbarkeit und Lagerung von LP-Hybridimmobilisaten bei 35 °C	39
4.2.20	Bestimmung der kinetischen Parameter von SP- und LP-Hybridimmobilisaten .....	40
4.2.21	Bestimmung der kinetischen Parameter von bienzymatischen (SP, LP) Hybridimmobilisaten .....	41
4.2.22	Optimierung der Immobilisierung auf Epoxyträgern (Purolite) .....	42
4.2.23	Optimierung der Immobilisierung auf Aldehydträgern (Purolite) .....	42
4.2.24	Charakterisierung von LP auf Epoxy und Aldehydträgern .....	43

4.2.24.1	Wiederverwendung von LP auf Epoxy- und Aldehydträgern und SP auf Epoxyträgern .....	43
5	Ergebnisdiskussion .....	44
5.1	Screening von Immobilisierungsmethoden.....	44
5.2	Immobilisierung von Enzymen auf Sepabeads.....	46
5.2.1	Optimierung der Immobilisierung auf Sepabeads .....	46
5.2.2	Charakterisierung der Enzyme (auf Sepabeads) und GI- Granulat – Festlegung von Reaktionsbedingungen.....	49
5.2.2.1	Sucrosephosphorylase.....	49
5.2.2.2	Laminaribiosephosphorylase.....	53
5.2.2.3	Glucoseisomerase.....	55
5.2.2.4	Vergleich optimaler Bedingungen der Enzyme und Festlegung trienzymatischer Bedingungen.....	59
5.2.3	Charakterisierung der Enzyme unter multienzymatischen Bedingungen.....	62
5.2.3.1	Stabilität und Wiederverwendbarkeit von SP und LP .....	63
5.2.3.2	Exkurs: Untersuchung weiterer kovalenter Träger auf höhere Stabilität und bessere Wiederverwendbarkeit .....	65
5.2.3.3	Kinetik.....	67
5.2.3.3.1	Sucrosephosphorylase .....	67
5.2.3.3.2	Laminaribiosephosphorylase .....	71
5.2.3.4	Versuch der bienzymatischer Produktion von Laminaribiose mit Glucose als Cosubstrat und Entwicklung eines bienzymatischen Modells .....	76
5.3	Verbesserung der Stabilität von Sepabead immobilisierten Enzymen .....	78
5.3.1	Screening von Biopolymeren.....	78
5.3.2	Optimierung der Immobilisierung .....	79
5.3.3	Charakterisierung der Immobilisate.....	81
5.3.3.1	Charakterisierung von Laminaribiosephosphorylase mit statistischer Versuchsplanung .....	81
5.3.3.2	Festlegung bienzymatischer Bedingungen .....	85
5.3.4	Charakterisierung der Enzyme unter bienzymatischen Bedingungen .....	87
5.3.4.1	Stabilität und Wiederverwendbarkeit.....	87
5.3.4.2	Lagerung .....	90
5.3.4.3	Kinetik.....	90
5.3.4.3.1	Sucrosephosphorylase .....	91
5.3.4.3.2	Laminaribiosephosphorylase .....	95
5.3.4.3.3	Bienzymatische Hybridimmobilisate .....	99

5.4	Vergleich der Immobilisierungsmethoden und Träger .....	103
6	Zusammenfassung.....	106
7	Ausblick.....	108
8	Literaturverzeichnis.....	109
9	Anhang.....	127
9.1	ANOVA SP- und LP-Sepabeads und GI-Granulat .....	127
9.2	Verwendete Matlab-Programme .....	131
9.2.1	Funktion zur Modellierung eines Batch-Versuches.....	131
9.2.2	Skript zur Modellierung eines Batch-Versuchverlaufs .....	132
9.2.3	Skript zur Optimierung der Suc-Konzentration und SP-Menge.....	132
9.2.4	Skript zur Optimierung des Enzymverhältnisses .....	133
9.2.5	Skript zur Optimierung der Glc-Konzentration.....	133
9.3	ANOVA der LP-Hybridimmobilisate .....	134



# Symbol und Abkürzungsverzeichnis

## Symbolverzeichnis

Zeichen	Einheit	Bedeutung
c	[mol/L] / [g/L]	Konzentration
k	[s <sup>-1</sup> ] / [min <sup>-1</sup> ]	Geschwindigkeitskonstante
K <sub>I</sub>	[mol/L]	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K <sub>M</sub>	[mol/L]	Michaelis-Menten-Konstante
M	[mol/L]	Molarität
MWCO	[Da]	Molekulargewichtsgrenzwert (englisch molecular weight cut off)
N	[-]	Wiederholungsanzahl
Na-P	[mol/L]	Natriumphosphat
t	[min] / [s] / [h] / [Tage]	Zeit
T	[°C]	Temperatur
U		Enzymeinheit, Menge Enzym die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt
Units	U	Enzymaktivität
v/ v <sub>max</sub>	[mol/L*min] / [mol/g*min]	(Maximal-)geschwindigkeit
V <sub>R</sub>	[mL] / [L]	Volumen des Reaktionsgefäßes
β	[-]	Regressionskoeffizient
ε	[-]	statistischer Fehler
η	[mmol/g] / [µmol/g]	Systemantwort

## Abkürzungsverzeichnis

Zeichen	Bedeutung
[G] <sub>e</sub>	Glucosekonzentration im Gleichgewicht
6-APA	6-Aminopenicillansäure
ANOVA	Varianzanalyse (englisch analysis of variance)
Asp-X	Asparaginsäure an Position X
batch	absatzweise
BRENDA	BRaunschweiger ENzym DATenbank
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCC	Central Composite Circumscribed Design
CCD	Zentral zusammengesetzter Versuchsplan (englisch central composite designs)
CCF	Central Composite Face centered Designs
CCI	Central Composite Inscribed Design
CLEAs	Quervernetzte Enzymaggregate (englisch cross linked enzyme aggregates)
CLECs	Quervernetzte Enzymkristalle (englisch cross linked enzyme crystals)
CSTR	kontinuierlich gerührter Tankreaktor (englisch continuous stirred tank reactor)
d	Tag
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGMP	desoxy Guanosinmonophosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat

Zeichen	Bedeutung
DNA	Desoxyribonucleinsäure (englisch Desoxyribonucleic acid)
E	Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i>
$E_0$	Ausgangskonzentration des Enzyms
EC	Enzymkommissionsnummer (englisch Enzyme Commission number)
ES	Enzym-Substrat-Komplex
fed-batch	Zufütterung
Fru	Fructose
GH13	Glycosidhydrolase Familie 13
GH94	Glycosidhydrolase Familie 94
GI	Glucoseisomerase
Glu	Glucose
Glucose-1P / G1P	Glucose-1-phosphat
Glu-X	Glutaminsäure an Position X
H <sub>2</sub> O	Wasser
HFCS	Maissirup/ Fructose-Glucose-Sirup (englisch High Fructose Corn Sirup)
HPAEC	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie (englisch High Performance Anion Exchange Chromatography)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch High Performance Liquid Chromatography)
I	Inhibitor
ISPR	Reaktionsintegrierte Produktgewinnung (englisch <i>in situ</i> product removal)
K	Gleichgewichtskonstante
K	Kelvin
Lam	Laminaribiose
Lam3	Laminaritriose
LP	Laminaribiosephosphorylase
Max	Maximierung
Min	Minimierung
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (englisch molecular weight cut off)
NaOH	Natriumhydroxid
Na-P	Natriumphosphat
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Ammoniak
P	Produkt
pK <sub>A</sub> /pK <sub>S</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante $K_S$
Plug-Flow	Pfropfenströmungsreaktor
RSM	Resonse Surface Methodology/ Wirkungsflächenversuchsplan
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SP	Sucrosephosphorylase
STR	Rührreaktor (englisch stirred tank reactor)
Suc	Saccharose (englisch sucrose)
UDP	Uridindiphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
X	unabhängiger Parameter

# 1 Einleitung

Für die politischen Entscheidungsträger dieser Welt ist eine nachhaltige Entwicklung zur Priorität geworden. Unter den Technologien, mit dem Potenzial Nachhaltigkeit erreichen zu können, kann die Biotechnologie, insbesondere in den Bereichen Nahrungsmittelproduktion, erneuerbare Rohstoffe, Verschmutzungsprävention und Biosanierung, eine wichtige Rolle spielen [1]. Die Industrielle Biotechnologie, auch weiße Biotechnologie genannt, nutzt die moderne Biotechnologie zur nachhaltigen Produktion von Chemikalien, Materialien und Energien aus erneuerbaren Ressourcen [2]. Garantiert wird die Nachhaltigkeit durch die Verwendung ungefährlicher und erneuerbarer Rohstoffe, geringe Abfallproduktion, niedrigen Energieverbrauch, und hohe Effizienz [3].

Auf dem Markt werden immer mehr biobasierte Produkte, von Biotensiden bis biobasierten Polymeren, angeboten. Dies belegt, dass die Biotechnologie beim Ersatz petrobasierter Produkte für die chemische Industrie immer wichtiger wird [4]. Zusätzlich wird erwartet, dass Durchbrüche in der Enzymtechnologie, der Synthetischen Biologie und der „omik“-Werkzeuge, zusammen mit der mathematischen Systembiologie, die industrielle Nutzung der Biotechnologie weiter beschleunigen werden [2].

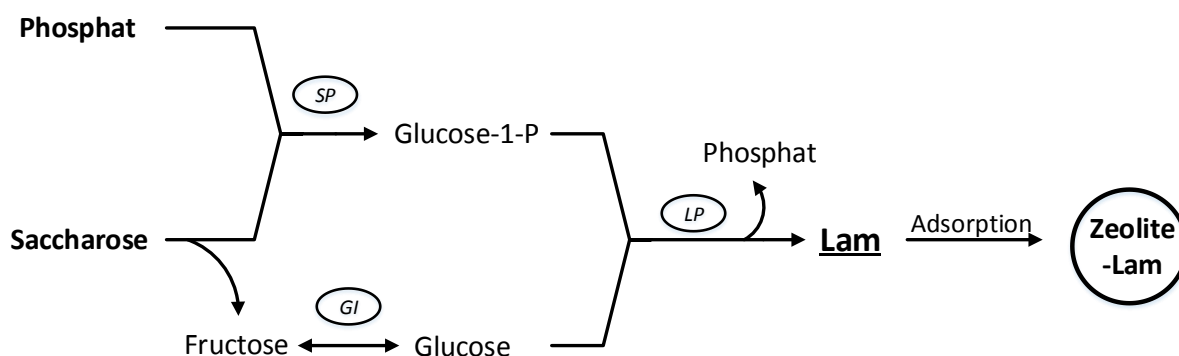
Für eine schnelle Prozessentwicklung sind vor allem Prozesse mit isolierten Enzymen zugänglich, da im Vergleich zu Katalysen mit ganzen Zellen weniger Nebenreaktionen und Stoffwechselprodukte auftreten, die vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden müssen. Die Vorteile werden allerdings begleitet von höheren *Upstreamkosten* und der Notwendigkeit Enzyme wiederzuverwenden, um die Kosten des Prozesses überschaubar zu halten [5]. Die Wiederverwendung kann durch Immobilisierung der Enzyme ermöglicht werden. Immobilisierung bedeutet, dass das Enzym aus einer löslichen Form in eine unlösliche Form überführt wird [6]. Neben dem offensichtlichen Grund der Wiederverwendung und damit der Verbesserung der Wirtschaftlichkeit hat die Immobilisierung von Enzymen weitere Vorteile, wie eine einfache Abtrennung nach Abschluss der Reaktion durch Filtration, Zentrifugation etc. sowie einer Anwendbarkeit in kontinuierlichen Prozessen, im Festbett oder in der Wirbelschicht oder gerührten Reaktoren, die mit Filtrationssystem für die Rückhaltung ausgestattet sind [7].

Biokatalytische Umwandlungen können auf unterschiedlichste Art und Weise realisiert werden. So kann beispielsweise ein einzelnes Enzym genutzt werden, das eine spezifische Reaktion katalysiert oder mehrere Enzyme, die eine Reihe von Umwandlungen katalysieren um das gewünschte Produkt zu erhalten. Solche Mehr-Schritt-Katalysen können sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* umgesetzt werden. Eine *ex vivo* multienzymatische Reaktion bietet eine stark reduzierte Komplexität und damit eine erleichterte Prozesskontrolle. Reaktionen können leicht, zum Beispiel durch Variation der Enzym- und Substratkonzentrationen, Veränderung des pH-Wertes und der Temperatur, optimiert werden [8]. Werden die Reaktionen dabei in einem einzigen Reaktor (*one-pot*-Prozess) durchgeführt, reduzieren sich die Handhabungsschritte, der Reagenzienverbrauch und es kommt zu einer Steigerung der volumetrischen Produktivität [9], [10]. Im Kontext der sauberen biokatalytischen Produktion haben *one-pot*-Prozesse großes Potenzial [11].

## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des DFG geförderten Projekts „Integration von Reaktion und Produktabtrennung für trienzymatisch katalysierte Synthesen hochwertiger Oligosaccharide aus Saccharose“ (JO 355/3-2 und SCHO 842/9-2). Ziel des Projektes ist die Darstellung einer kontinuierlichen trienzymatischen Produktion von Laminarbiose mit reaktionsintegrierter Adsorption auf Zeolithen. Die beteiligten Enzyme sind Saccharosephosphorylase (SP), Glucoseisomerase (GI) und Laminarbiosephosphorylase (LP). Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der Prozess beginnt mit der Phosphorylierung von Saccharose durch SP unter Bildung von Fructose und Glucose-1-phosphat. Die gebildete Fructose wird durch GI zu Glucose isomerisiert. In einem dritten Reaktionsschritt nutzt LP die Glucose zusammen mit Glucose-1-phosphat aus der ersten Reaktion zur Bildung von Laminarbiose. Dabei wird Phosphat frei, das wiederum im ersten Reaktionsschritt genutzt wird. Um das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Bildung von Laminarbiose zu verschieben und eine Bildung höherer Oligosaccharide aus Laminarbiose zu verhindern, wird die gebildete Laminarbiose auf Zeolithen adsorbiert.



**Abbildung 1** Reaktionsschema der trienzymatischen Produktion von Laminarbiose mit reaktionsintegrierter Adsorption des Produkts Laminarbiose (Lam) auf Zeolithen. Substrate sind fettgedruckt, das Produkt fett und unterstrichen, die Enzyme kursiv.

Die Nutzung der katalytischen Aktivität der Enzyme ermöglicht die Produktion des hochwertigen Zuckers Laminarbiose aus dem günstigen und erneuerbaren Rohstoff Saccharose bei niedrigen Temperaturen und Normaldruck ohne giftige Abfall- und Nebenprodukte. Damit erfüllt der Prozess wichtige Kriterien für eine nachhaltige Produktion. Laminarbiose (3- $\beta$ -D-Glucosyl-D-glucose) hat prebiotische Eigenschaften [12] und ist ein leistungsstarkes Auskeimungsagens [13]. Daneben wurde Laminarbiose von Mearls et al. [14] als Induktor bei der Entwicklung eines regulierbaren Plasmid-basierten Genexpressionssystems für *Clostridium thermocellum* genutzt. Trotz der vielversprechenden Möglichkeiten wird es aufgrund der hohen Produktionskosten bisher nicht in größerem Maßstab eingesetzt [15]. Zur trienzymatischen Produktion alternative Herstellungsverfahren, wie die Behandlung von Glucose mit ionischen Flüssigkeiten [16], die chemische Synthese [13] oder die Degradation des mikrobiellen Polysaccharids Curdlan [17], benötigen hohe Temperaturen oder giftige Reagenzien zur Laminarbioseherstellung.

Bei der Umsetzung einer *in situ*-Trennung von Komponenten aus der Reaktionsmischung, wie hier der reaktionsintegrierten Adsorption, sollten die Enzyme immobilisiert vorliegen [18]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst für die Enzyme des multienzymatischen Systems eine Immobilisierungsmethode gefunden werden, die sich auch für eine kontinuierliche Produktion mit

reaktionsintegrierter Adsorption eignet. In einem zweiten Schritt sollten, basierend auf einer Charakterisierung der Enzymimmobilisate, Bedingungen für die multienzymatische Produktion von Laminaribiose gefunden, festgelegt und die Eigenschaften der immobilisierten Enzyme unter diesen Bedingungen untersucht werden.

### 3 Theorie

Enzyme sind katalytisch aktive Proteine, die im Laufe von Milliarden von Jahren Evolution entstanden und perfektioniert wurden. Als sehr spezifische und effiziente Katalysatoren lenken sie die Chemie des Lebens, ohne dazu extreme Temperaturen, hohe Drücke oder korrosive Bedingungen zu benötigen [3]. Sie sind an allen essentiellen Prozessen des Lebens beteiligt, wie DNA Replikation und Transkription, Proteinbiosynthese, Metabolismus, Signaltransduktion [19].

Auch für industrielle Anwendungen werden Enzyme und ihre erstaunlichen Fähigkeiten zunehmend genutzt. Diese technische Disziplin wird Biokatalyse genannt [3]. Vier Enzymklassen sind für die synthetische Chemie besonders wichtig: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Lyasen [20]. Nach Li et al. [19] gab es 2012 beinahe 4000 bekannte Enzyme, von denen ungefähr 200 Enzyme mikrobiellen Ursprungs kommerziell genutzt werden. Die Enzymdatenbank BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase) enthielt 2017 bereits über 7000 verschiedene Enzyme (Stand 7.3.2017: 7095). In der Biokatalyse werden Enzyme als Prozesskatalysatoren unter künstlichen Bedingungen (*in vitro*) eingesetzt. Die Umwandlung der Enzyme in Prozesskatalysatoren, die auch unter den in der Regel schwierigen Bedingungen industrieller Prozesse aktiv sind, ist eine große Herausforderung [21].

Enzyme haben einige Eigenschaften, die ihren Einsatz im Vergleich zu konventionellen chemischen Katalysatoren vorteilhaft machen. Dabei ist vor allem das hohe Level katalytischer Effizienz zu nennen, das oft weit besser ist als das chemischer Katalysatoren und ein hohes Maß an Spezifität, das es ihnen nicht nur erlaubt, zwischen Reaktionen, sondern auch zwischen Substraten (Substratspezifität), unterschiedlichen Teilen des Moleküls (Regiospezifität) und zwischen optischen Isomeren (Stereospezifität) zu unterscheiden. Enzyme operieren außerdem üblicherweise unter milden Temperaturen, Drücken und pH-Werten mit Reaktionsraten, die chemische Katalysatoren nur unter extremeren Bedingungen erreichen. Zusätzlich sind sie biologisch abbaubar und lassen sich leicht aus kontaminierten Strömen entfernen [22]. Biokatalytische Synthesen sind daher in der Regel atom- und schrittökonomischer sowie weniger energieintensiv und verursachen weniger Abfall als konventionelle organische Synthesen. Trotz dieser Vorteile wird die Kommerzialisierung oft durch mangelnde operative Stabilität und Lagerstabilität in Verbindung mit aufwendiger Rückgewinnung, Recycling und Produktkontamination behindert [23], [24].

Es gibt verschiedenste Strategien, die Nachteile von Enzymen zu umgehen oder abzuschwächen. Zu diesen gehören:

- a) Screening der Biodiversität nach Enzymen mit verbesserten Eigenschaften
- b) die Verbesserung von Enzymeigenschaften mit Hilfe molekularbiologischer Techniken
- c) die Verbesserung von Enzymen durch Immobilisierung und post-Immobilisierungstechniken
- d) die Verbesserung von Enzymeigenschaften über Reaktions- und Reaktorengineering [25].

Enzymtechnologisches Konzepte können enzymatische Reaktionen beispielsweise dazu zwingen, in eine gewünschte Richtung abzulaufen, ihre Selektivität verbessern und Enzyme für Reaktionsbedingungen stabilisieren, die für großtechnische Synthesen benötigt werden [26]. *Protein engineering* beschäftigt sich mit dem Design und der Konstruktion neuer Enzyme mit maßgeschneiderten funktionellen Eigenschaften, einschließlich Stabilität, katalytischer Aktivität, Reaktionsproduktinhibierung und Substratspezifität [27].

Es ist möglich, dass zur Umsetzung eines Substrats zum gewünschten Produkt die Zusammenarbeit mehrerer Enzyme in einer Kaskade benötigt wird. Dabei kann es schwierig sein, die Mehr-Schritt-Reaktion effizient in die gewünschte Richtung zu dirigieren, insbesondere wenn reaktive Intermediate vorhanden sind [28]. Bei Mehr-Schritt-Reaktionen können entweder alle Enzyme gleichzeitig in den Reaktor gegeben werden (*one-pot*) oder nacheinander [29]. Es gibt zahlreiche Beispiele für Untersuchungen solcher multienzymatischen Reaktionen. Li et al. [30] beschäftigten sich beispielsweise mit einer *one-pot* tetraenzymatischen Kaskadenreaktion zur Produktion von Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP). Qi et al. [31] produzierten in einer *one-pot*-Reaktion synthetische Amylose. Yang et al. [32] nutzten ein pentaenzymatisches System zur *one-pot*-Produktion von Desoxythymidindiphosphat-Zuckern. Weitere Beispiele für die Umsetzung multienzymatischer Reaktionen sind in folgenden Arbeiten zu finden: [33], [34], [35], [36], [37], [38], [39], [32].

In der Industrie werden Enzyme in verschiedensten Gebieten eingesetzt, wie Nahrungsmittelherstellung, Futtermittelproduktion, Kosmetik, Arzneimittel und als Werkzeug für Forschung und Entwicklung [19]. Mit dem Einsatz von Enzymen in der Industrie befassen sich zahlreiche Übersichtsartikel: Schmid et al. [40] - Einsatz von Enzymen in der chemischen Industrie; Narancic et al. [41] - in großem Maßstab umgesetzte Biokatalysen; Beilen und Li [42] - Anwendungen von Enzymen in der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Landwirtschaftlichen -, Papier-, Leder- und Textilindustrie sowie der chemischen Industrie und im Pharmasektor.

Zu den wichtigen industriellen biokatalytischen Prozessen gehört die Produktion von 6-Aminopenicillansäure (6-APA) mithilfe von Penicillinacylasen durch Firmen wie Smith Kline Beecham (Harlow, UK), Pfizer (Groton, US), Toyo (Tokio, Jp) und DSM (Heerlen, NL) [43]. Produkte, die mit Enzymen in Quantitäten über 1000 t/a hergestellt werden, sind beispielsweise Fructose-Glucose-Sirup [*High Fructose Corn Sirup* (HFCS)] mit Hilfe von Glucoseisomerase, Isomaltulose mit Sucrosemutase (Südzucker, Cerestar) und Acrylamid mit Nitrilhydratase (Nitto) [7].

Aufgrund der drastischen Reduktion von *Down-Stream*-Schritten, die zu einer besseren Nutzung der Ressourcen führen, werden auch multienzymatische Prozesse zunehmend attraktiver für die Produktion von Chemikalien und Pharmazeutika auf industriellem Level. *One-pot*-Prozesse stellen das am häufigsten verfolgte Konzept bei der Umsetzung multienzymatischer Synthesen dar [44]. Ein Beispiel für einen effizienten multienzymatischen Prozess wurde bereits 1989 von Vasič-Racki et al. [45] vorgestellt. Darin beschreiben sie die kontinuierliche Produktion von (R)-Mandelsäure in einem Enzymmembranreaktor mit Hilfe einer Mandelatdehydrogenase und Formatdehydrogenase mit Raum-Zeit-Ausbeuten von 700 g/(L·d).

### 3.1 Immobilisierung

Immobilisierung, d.h. die Umwandlung eines wasserlöslichen Enzyms in eine solide Katalysatorform [6], stellt eine Möglichkeit dar, die Eigenschaften von Enzymen für den technischen Einsatz zu verbessern. So kann Immobilisierung die Stabilität von Enzymen verbessern und den Einsatz von Enzymen in organischen Lösemitteln oder unter extremen pH-Werten und Temperaturen sowie außergewöhnlich hohen Substratkonzentrationen ermöglichen. Zur gleichen Zeit kann die Substratspezifität, Enantioselektivität und Reaktivität modifiziert sein [46]. Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung des Biokatalysators besteht in der Möglichkeit, Reaktionen durch schnelle und einfache Abtrennung des Biokatalysators vom Reaktionsmedium abzustoppen [47].

Als mögliche Gründe für eine Stabilisierung von Enzymen durch Immobilisierung nennen Liese und Hilterhaus [48] unter anderem die *Multipoint*- und *Subunit*-Bindung von Enzymen an Oberflächen, die Erzeugung vorteilhafter Mikroumgebungen und das Verhindern intermolekularer Interaktionen (Gasblasen, andere Proteinmoleküle, Proteasen).

Es existieren zahlreiche unterschiedlichste Immobilisierungsmethoden. Nach Sheldon [49] lassen sie sich in folgende drei Hauptkategorien einteilen:

1. Bindung der Enzyme an einen vorgefertigten Träger
2. Einschluss der Enzyme in organische oder anorganische Polymermatrizes
3. Quervernetzung von Enzymmolekülen

Dabei gibt es keine Methode, die für alle Enzyme und ihre Anwendung geeignet ist. Verantwortlich dafür sind die stark unterschiedlichen chemischen Charakteristika und Zusammensetzungen von Enzymen, unterschiedliche Eigenschaften von Substraten und Produkten sowie die unterschiedlichen Verwendungszwecke des Produkts [22]. So wurde beispielsweise Glucoseisomerase für eine Nutzung im HFCS-Prozess von Lehmacher und Bisswanger [50] auf epoxyaktivierter Agarose immobilisiert und von Chandrakant und Bisaria [51] auf Eierschalen für den Einsatz in der Ethanolherstellung.

Alle Immobilisierungsmethoden haben Vor- und Nachteile. Die optimalen Immobilisierungsbedingungen müssen normalerweise für ein gewähltes Enzym empirisch über Versuch und Irrtum gefunden werden, um sicherzustellen, dass die größtmögliche Aktivität, operative Stabilität und Haltbarkeit des Enzyms gegeben ist [22]. Der Schlüssel zur optimalen *Performance* eines Enzyms ist oft eine Frage der Entwicklung einer effektiven Methode für seine Immobilisierung [52].

Bei der Auswahl einer Immobilisierungstechnik sollten die Stabilität, Aktivität, Handhabbarkeit und die Kosten des immobilisierten Enzyms ebenso wie die physikochemischen Eigenschaften der Immobilisierungsmatrix, Enzym-Oberflächen-Interaktionen, das Reaktionsmedium und die Reaktorkonfiguration sowie die Art des *Downstream-Processing* in Betracht gezogen werden [53], [54]. Für die Großproduktion sollten Verfahren schnell, robust, vergrößerbar und reproduzierbar sein und das Enzym während aller Schritte stabil sein. Zusätzlich sollten Arbeitsschutzfragen, wie der Umgang mit quervernetzenden Chemikalien und staubenden Materialien, berücksichtigt werden [55].

### **3.1.1 Immobilisierung über Trägerbindung**

Es gibt zahlreiche Methoden zur Immobilisierung von Biokatalysatoren auf Trägern wie die kovalente und ionische Anbindung sowie die hydrophobe Adsorption [56]. Physikalische Kräfte wie hydrophobe Interaktionen, Van-der-Waals Bindungen oder ionische Interaktionen sind in der Regel zu schwach, um das Enzym unter rigorosen industriellen Bedingungen bei hohen Substrat- und Produktkonzentrationen und hoher Ionenstärke auf dem Träger zurück zu halten. Die kovalente Bindung von Enzymen führt dagegen zu robusteren Biokatalysatoren, die auch in wässrigen, mehrphasigen oder viskosen Mischungen eingesetzt werden können [57]. Führt die Immobilisierung zur Konformationsänderung der Enzyme oder zur Beteiligung reaktiver Gruppen des aktiven Zentrums der Enzyme an der Bindung, kann jedoch auch ein Verlust an Enzymaktivität durch die Immobilisierung verursacht werden [58]. Sind mehrere Enzyme für die Produktbildung nötig, ist es prinzipiell möglich, diese zu co-immobilisieren (Co-Lokalisierung) [59].

Die Eigenschaften immobilisierter Enzympräparationen werden sowohl von den Eigenschaften des Enzyms als auch des Trägermaterials beeinflusst. Die Interaktion zwischen beiden führt zu



immobilisierten Enzymen mit spezifischen (bio-)chemischen, mechanischen und kinetischen Eigenschaften. Der Träger sollte daher mit großer Sorgfalt ausgewählt werden [60]. Typische Trägermaterialien sind synthetische Harze, Biopolymere (z. B.: Polysaccharide) oder anorganische Festkörperteilchen wie (mesoporöse) Silikate oder Zeolithe [54].

Bei der Auswahl des Trägermaterials wichtige Kriterien sind:

1. die Bindungskapazität des Trägermaterials, die eine Funktion der Ladungsdichte, der funktionellen Gruppen, der Porosität und der Hydrophobizität der Trägeroberfläche ist
2. die Stabilität und der Erhalt der Enzymaktivität, die eine Funktion der funktionellen Gruppen des Trägermaterials und der Mikroumgebungsbedingungen ist [58].

Eine essentielle Bedingung für einen Träger ist eine große Oberfläche. Das kann entweder durch Materialien mit kleiner Partikelgröße erreicht werden, was die Abtrennung allerdings schwierig macht, oder mit hochporösen Materialien, die nicht diffusionslimitierend auf die Substrate wirken. Zusätzlich muss das Material chemisch und mechanisch stabil sein. Neben den Eigenschaften des Trägers sollten die Oberflächeneigenschaften des Enzyms in Betracht gezogen werden. So können polare Gruppen (z. B.:  $\epsilon$ -Aminogruppen bei Lysin und terminale Carboxylgruppen bei Asparagin- und Glutaminsäure), unpolare Oberflächenbereiche oder Zuckerkomponenten die Eigenschaften der Oberfläche beeinflussen [46].

#### **3.1.1.1 Immobilisierung über Adsorption**

Die einfachste Immobilisierungsmethode ist die nicht spezifische Adsorption, die hauptsächlich auf physikalischer Adsorption, also Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waalskräften, hydrophoben Wechselwirkungen oder ionischer Bindung beruht. Durch Veränderungen der Bedingungen, die die Stärke der Interaktionen beeinflussen (pH, Ionenstärke, Temperatur oder Polarität des Lösemittels), lässt sich der Prozess umkehren [61]. Aufgrund der schwachen Bindungskräfte ist die Desorption von Enzymen ein großes Problem, insbesondere bei Anwesenheit starker hydrodynamischer Kräfte [58]. Um das Ausbluten zu verhindern, empfehlen Hanefeld et al. [46] die Nutzung adsorbierter Enzyme in organischen Lösemitteln oder rein hydrophoben Reaktanten.

Als Trägermaterialien können anorganische Materialien, wie Tonerde (Aluminiumoxid), Kieselerde, poröses Glas, Keramiken, Kieselgur, Ton und Bentonit, oder organische Materialien, wie Cellulose, Stärke und Aktivkohle, sowie Ionenaustauscherharze, wie Amberlite, Sephadex und Dowex, genutzt werden [58]. Viele dieser Träger sind billig, reichlich vorhanden, mechanisch und chemisch stabil, nicht toxisch, umweltfreundlich und nach Verwendung leicht regenerierbar [62].

Bei **Bentonit** handelt es sich um ein mehrschichtiges Material, das hauptsächlich aus Montmorillonit besteht [63]. Zu den Vorteilen von Bentonit bzw. der Immobilisierung von Enzymen auf Bentonit gehören seine hohe spezifische Oberfläche, das reichliche Vorkommen in der Natur, die geringen Kosten, seine chemische und bakterielle Resistenz sowie seine Ungiftigkeit und die chemische Reaktivität [64], [63]. Beispiele für Immobilisierungen von Enzymen auf Bentonit sind die Immobilisierung von Katalase durch Cengiz et al. [65], die Immobilisierung von  $\alpha$ -Amylase durch Sedaghat et al. [66] und die Immobilisierung einer Alkalischen Phosphatase durch Ghiaci et al. [64].

#### **3.1.1.2 Immobilisierung über kovalente Bindung**

Bei der Immobilisierung über kovalente Bindung wird eine Bindung zwischen Aminosäureseitenketten des Proteins und reaktiven Gruppen auf der Trägeroberfläche ausgebildet. Sie wird häufig dann

genutzt, wenn der Proteinwert hoch ist, Ausbluten minimal gehalten werden soll oder rationales Design der Biokatalysatoreigenschaften gewünscht ist [67]. Die Immobilisierung über kovalente Bindung gehört zu den irreversiblen und beliebtesten Immobilisierungsmethoden [68].

Am häufigsten sind nukleophile Amino- (Lysin, Histidin und Arginin) und Hydroxylgruppen (Serin, Threonin und Tyrosin) sowie elektrophile Carboxylgruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) an einer kovalenten Bindung beteiligt [67]. Dabei ist es wichtig, dass die katalytisch funktionalen Gruppen des Enzyms nicht an der kovalenten Bindung an den Träger beteiligt sind, sodass es nicht zu einer Veränderung der enzymatischen Aktivität oder Inaktivierung des Enzyms kommt [69].

Auf den Immobilisierungsträgern sind Epoxy- und Glyoxylgruppen als reaktive Gruppen sehr geeignet. Eine weitere beliebte Technik für die Immobilisierung von Enzymen ist die Glutaraldehyd-Chemie [70]. Cantone et al. [57] geben einen Überblick über funktionelle Gruppen auf Trägern, Bindungen und funktionellen Gruppen auf Enzymen.

Insbesondere eine Multipunktimmobilisierung, die kovalente Bindung jedes Enzymmoleküls an mehrere aktivierte Gruppen, führt zu einem hohen Maß an Stabilisierung. Dabei wird erwartet, dass der Stabilisierungsgrad mit der Zahl der Enzym-Trägerbindungen zunimmt. Allerdings ist anzunehmen, dass eine obere Grenze existiert, da die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums oder sogar die katalytische Aktivität beeinflusst wird. Die Anzahl der entstehenden Bindungen ist abhängig vom Aktivierungsgrad des Trägers (Konzentration der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche) und von der Anzahl der verfügbaren Aminogruppen auf der Enzymoberfläche [71]. Da die Bildung mehrerer kovalenter Bindungen zwischen Enzym und Träger die konformative Flexibilität und thermische Schwingungen verringert und dadurch das Auffalten von Proteinen und die Denaturierung verhindert wird, sollte die kovalente Immobilisierung dann anderen Methoden vorgezogen werden, wenn in wässriger Lösung gearbeitet wird oder denaturierende Faktoren vorhanden sind [46].

Es können hydrophile oder hydrophobe Trägermaterialien eingesetzt werden, wobei die reaktiven Gruppen über kurze oder lange Spacer auf die Träger gebunden werden [46].

#### **3.1.1.2.1 Epoxy-Träger**

Trägermaterialien, die mit Epoxygruppen funktionalisiert wurden, stellen beinahe ideale Matrizen für eine sehr einfache Immobilisierung von Proteinen sowohl im Labor- als auch im Industriemaßstab dar. Die Epoxygruppen können chemisch mit allen nukleophilen Gruppen auf der Proteinoberfläche reagieren, wie sie bei Lysin, Histidin, Cystein, Tyrosin, etc. zu finden sind. Die Immobilisierung erfolgt über einen zweistufigen Mechanismus:

1. eine schnelle und milde physikalische Adsorption des Proteins an den Träger
2. eine kovalente Reaktion zwischen dem adsorbierten Protein und der benachbarten Epoxygruppe.

Aufgrund dieses Mechanismus sind kommerzielle Epoxyträger relativ hydrophob, sodass Proteine bei Inkubation bei hoher Ionenstärke (über hydrophobe Wechselwirkungen) adsorbiert werden [72]. Damit es zur Reaktion kommt, müssen die nukleophilen Gruppen auf der Oberfläche des Enzyms deprotoniert vorliegen, weshalb in der Regel hohe pH-Werte benötigt werden. Epoxygruppen sind starke Elektrophile und können daher schnell bei neutralen pH-Werten mit Aminogruppen reagieren [73].

Einer der ersten kommerziell verfügbaren, mit Epoxygruppen funktionalisierten Träger, war **Eupergit C**. Dabei handelt es sich um ein makroporöses Copolymer aus Methacrylamid, Glycidylmethacrylat und Allylglycidylether, das mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid quervernetzt wurde. Es hat eine durchschnittliche Partikelgröße von 170 µm und eine Porengröße von 25 nm. Eupergit C ist hoch hydrophob und adsorbiert ungefähr die dreifache Masse seines Eigengewichts an Wasser. Aufgrund der hohen Dichte an Epoxygruppen auf seiner Oberfläche (>0,6 mmol pro g trockenen Eupergit C) kann ein Enzym mehrere Verbindungen (Multipunkt-Immobilisierung) ausbilden. Das wird als wesentlicher Faktor für die hohe operative Stabilität von Eupergit C gebundenen Enzymen angesehen. Heute gibt es neben Eupergit C noch weitere Epoxyacrylatpolymere [57]. Eine Immobilisierung auf Eupergit ist schnell und einfach. Ausserdem gibt es keinen Bedarf an zusätzlichen Reagenzien und speziellem Equipment. Bei der Standardprozedur wird das Enzym in einem wässrigen Puffer gelöst und nach Zugabe von Eupergitträgern für 12-72 h bei Temperaturen von 4 °C bis Raumtemperatur inkubiert [20].

Ein Beispiel für eine Immobilisierung auf Eupergit C, bei der viel katalytische Aktivität erhalten blieb und eine verbesserte Thermostabilität erreicht wurde, stammt von Hernaiz und Crout [74]. Weitere Beispiele für Immobilisierungen auf Eupergit sind: [75], [76], [77], [78], [79], [80], [81]. Ein Vergleich von auf Eupergit immobilisierten Enzymen mit anderen Trägermaterialien, im Hinblick auf ihr industrielles Potential, findet sich bei Katchalski-Katzir und Kraemer [82].

#### **3.1.1.2.2 Aldehyd-Träger**

Glutardialdehyd wurde bereits häufig als Quervernetzungsreagens eingesetzt. Gründe dafür sind seine Stabilität in wässriger Lösung und die schnelle Reaktion mit Amingruppen bei neutralem pH [83]. Habeeb und Hiramoto [84] fanden heraus, dass Glutardialdehyd mit den α-Aminogruppen von Aminosäuren, der N-terminalen Aminogruppen einiger Peptide und der Thiolgruppe von Cystein reagiert. Die Phenol- und Imidazolringe von Tyrosin- und Histidinderivaten sind ebenfalls teilweise reaktiv.

Bei der Immobilisierung von Proteinen mit Glutardialdehyd gibt es zwei Möglichkeiten:

1. die Verwendung von Trägern, die zuvor aktiviert wurden
2. die Behandlung von zuvor adsorbierten Proteinen auf Trägern mit primären Aminogruppen, mit Glutardialdehyd.

Dabei findet in beiden Fällen die kovalente Reaktion nach der Adsorption der Proteine über Ionenaustausch statt [29]. Im ersten Fall ist die chemische Modifikation der Enzyme auf die Proteingruppen beschränkt, die an der Immobilisierung beteiligt sind. Im zweiten Fall kann die gesamte Proteinoberfläche modifiziert werden [85].

Seit den 1960er Jahren wurde Glutardialdehyd unter anderem zur Bindung von Enzymen an Materialien wie Celluloseträgern, aminoalkylsilyliertes Glas, Polyacrylhydrazide, Phenylalanin-Lysin ummantelte Polystyrenperlen und Polyethylenimin behandeltes Magnetit, genutzt [86]. Chae et al. [87] konnten die Thermostabilität einer Protease durch Immobilisierung auf, mit Glutardialdehyd aktiviertem Lewatit R258-K, verbessern. Mendes et al. [88] immobilisierten zwei Lipasen auf einer kommerziellen Matrix (Toyoperal AF-amino.650M).

Der große Erfolg von Glutardialdehyd beruht auf der kommerziellen Verfügbarkeit und den geringen Kosten zusammen mit einer hohen bifunktionalen Reaktivität [86].

### 3.1.2 Einschluss

Immobilisierung über Einschluss bedeutet, dass Enzyme physikalisch in einem begrenzten Raum oder Netzwerk zurückgehalten werden [67]. Zu den zwei Hauptmethoden des Einschlusses gehören der Matrix- und der Membraneinschluss [58]. Ein solcher Einschluss schützt die Enzyme, indem der direkte Kontakt mit der Umgebung verhindert und damit Effekte von Gasblasen, mechanischem Stress und hydrophoben Lösemitteln minimiert werden [89]. Allerdings kommt es häufig zu Stofftransportlimitierung und/oder Ausbluten des Katalysators [67].

Biopolymere, natürlich auftretende Polysaccharide oder Proteine, wie Alginat, Chitosan, Cellulose usw., sind von Natur aus vielseitig verwendbar, widerstandsfähig und chemisch inert. Da es sich um Hydrogele handelt, bieten sie beim Einschluss eine geeignete Mikroumgebung mit exzellenter Kompatibilität mit dem Biokatalysator [90]. Normalerweise werden polymere Materialien wie Ca-Alginat, Agar,  $\kappa$ -Carrageen, Poylacrylamid und Collagen verwendet [58]. Bei der Immobilisierung in einer Polymermatrix wird die Enzymlösung mit der Polymerlösung gemischt, bevor es zum Einschluss kommt. Es können Partikeln, Membranen oder Fasern hergestellt werden [58], wobei das Polymernetzwerk die Diffusion von Reaktanten und Produkten erlauben muss, während eine Migration des Biokatalysators in das Medium verhindert wird [57]. In der Praxis wird die Technik aufgrund der für viele Enzymmoleküle zu hohen Porosität häufiger für Zellen als für Enzyme eingesetzt. Im Falle von Enzymen ist häufig eine zusätzliche kovalente Anbindung nötig [54].

**Chitosan**, ein billiges, weit verbreitetes lineares Polysaccharid aus zufällig verteilten  $\beta$ -(1-4) verknüpften-D-Glucosamin- und *N*-Acetyl-D-Glucosamin Einheiten, ist ein sehr interessantes Polymer für die Immobilisierung von Enzymen [71]. Zu seinen interessanten Eigenschaften gehören seine Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit, Ungiftigkeit, physiologische Inertheit, antibakteriellen Eigenschaften, Schwermetallionenchelatierung, Hydrophilität und seine beeindruckende Affinität zu Proteinen [22].

Hergestellt wird Chitosan durch *N*-Deacetylierung von Chitin, das kommerziell relativ günstig aus den Schalen von Krustentieren (hauptsächlich Krabben, Shrimps, Hummer und Krillen), Abfällen der Fischerei und *Seafood*-verarbeitenden Industrie gewonnen wird [22]. Chitosan wird durch seinen *N*-Acetylierungsgrad charakterisiert, der nicht nur seine physikochemischen Eigenschaften, sondern auch seine Bioabbaubarkeit und seine immunologische Aktivität beeinflusst [91]. Der Deacetylierungsgrad von kommerziell erhältlichem Chitosan liegt zwischen 60 und 90 % [92].

Chitosan ist in verdünnten organischen Säuren löslich. Dabei bilden sich abhängig vom Deacetylierungsgrad und dem pH-Wert viskose Lösungen, die zur Herstellung funktionaler Filme verwendet werden [93]. Das gelöste Polymer kann an seinen funktionellen Gruppen mit zahlreichen anderen Verbindungen zur Reaktion gebracht werden [92]. In saurer Lösung sind die Amingruppen des Chitosans protoniert. Die polyelektrolytischen und chelatbildenden Eigenschaften des Chitosan werden hauptsächlich durch die Azidität der  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe bestimmt [94]. Park et al. [94] berichten von einem  $\text{pK}_s$ -Wert von 6,1. Bei Anwesenheit eines Polyanions führen die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Polykation Chitosan und dem Polyanion (z. B.: Polyphosphat) zur Bildung eines Hydrogels. Charakteristisch für solche Netzwerke ist eine hydrophile Mikroumgebung mit hohem Wassergehalt und elektrischer Ladungsdichte [95].

Jaiswal et al. [96] nutzten die Komplexbildenden Eigenschaften des Chitosans zum Einschluss einer Laccase aus Papaya.

**Agar** ist ein komplexes Polysaccharid, das von verschiedenen Rotalgen produziert wird, sich bei Erhitzung auf 96 °C verflüssigt und bei Abkühlung bei 40 bis 45 °C in ein Gel aushärtet [97]. Es enthält zwei Gruppen von Polysacchariden: Agarose, als gelbildende Komponente, und Agaropektin. Agarose ist ein im Wesentlichen sulfatfreies, neutrales (nicht ionisches) Polysaccharid, Agaropektin ein nicht-gelierendes ionisches (geladenes) Polysaccharid. Die Grundeinheiten von Agarose sind D-Galactose, 3,6-Anhydrogalactose und D-Xylose. Agarosegele werden, vergleichbar mit Agargelen, durch Erhitzen der Agarose und anschließendem Absenken der Temperatur auf unter 40 °C hergestellt [98].

Swaroop et al. [99] nutzten Agar als Matrix zur Immobilisierung von *Penicillium chrysogenum* zur Penicillinproduktion in einem kontinuierlichen Rührkessel (CSTR). Prakash und Jaiswal [100] immobilisierten eine thermostabile Amylase aus Sojabohnen in Agarose und Agarmatrizen. Die Katalysatoren konnten in bis zu fünf Zyklen zur Entfernung von Stärkeflecken aus Kleidung genutzt werden.

### 3.1.3 Quervernetzung (*Crosslinking*)

Ein Nachteil der Immobilisierung auf einem Träger ist das geringe Enzym/Träger Verhältnis [101]. Dagegen bieten Methoden zur Immobilisierung ohne Träger eine hohe volumetrische Produktivität, geringere Herstellungskosten und gewinnen dadurch an Bedeutung [56].

Eine solche trägerlose Methode entwickelten Cao et al. [102] auf Basis von „*cross linked enzyme crystals*“ (CLECs) für Penicillinacylase. Dabei wird in einem ersten Schritt das Enzym ausgefällt und in einem zweiten Schritt die supermolekularen Strukturen aus dem ersten Schritt mit einem bifunktionalen Agens quervernetzt. Die entstehenden Immobilisate bezeichneten sie als „*cross-linked-enzyme-aggregates*“, kurz CLEAs.

Die Methode ist ausnehmend einfach und zugänglich für schnelle Optimierung und kann auf eine große Vielzahl von Enzymen angewendet werden. Man erhält stabile, wiederverwendbare Katalysatoren mit hoher erhaltener Aktivität, gelegentlich höher als die Aktivität des freien Enzyms. Das Enzym muss dabei nicht in hoher Reinheit vorliegen. Damit ist die Methode eine Kombination aus Aufreinigung (durch Ausfällen) und Immobilisierung [103].

Die Methode wurde von Cerdobbel et al. [104] zur Herstellung von CLEAs mit Sucrocephosphorylase aus *Bifidobacterium adolescentis* genutzt, die ein um 17 °C höheres Temperaturoptimum als das lösliche Enzym zeigten und ihre gesamte Aktivität bei Inkubation bei 60 °C über eine Woche behielten. Cabana et al. [101] setzten die Methode zur Immobilisierung einer Laccase ein und nutzten die erhaltenen CLEAs in einem kontinuierlichen Prozess zur Entfernung endokrin aktiver Chemikalien. Schoevaart et al. [105] entwickelten eine Hochdurchsatzmethode zur Herstellung und Optimierung von CLEAs.

Allerdings hat die CLEA-Technologie auch einige Nachteile. So sind CLEAs für viele industrielle Anwendungen in fast allen Reaktorkonfigurationen zu anfällig. Sie sind schwer zu handhaben und schwer vollständig wiederzugewinnen. Außerdem führen interne Stofftransportlimitierungen in CLEAs zu Zugänglichkeitsproblemen für makromolekulare Substrate [106].

Für viele Nachteile wurden Strategien entwickelt, um diese abzuschwächen.

Die Inaktivierung von Enzymen bei Quervernetzung mit Glutardialdehyd wurde durch Nutzung makromolekularer Crosslinker wie Dextranpolyaldehyd [56] oder Dialdehydstärke [107] umgangen. Aktivitätsverluste bei der Ausfällung der Enzyme wurden mit Zucker als Stabilisator verringert [108].

Die unzureichende mechanische Stabilität der CLEAs wurde erfolgreich durch den Einschluss von Penicillin G Acylase CLEAs in Lenticats umgangen [109]. Die Aktivität der eingeschlossenen CLEAs verringerte sich um ungefähr 40 %. Cabana et al. [110] entwickelten speziell für den kontinuierlichen Einsatz von Laccase CLEAs einen Durchstromkornreaktor. Dieser besteht aus einem Korb, der mit CLEAs gefüllt ist und kontinuierlich durch einen dreiblättrigen Marinepropeller durchmischt wird. Eine Diskussion weiterer Reaktortypen, die für CLEA-Anwendungen genutzt werden können, kann bei Talekar et al. [111] nachgelesen werden.

Zur Verringerung von Diffusionslimitierung innerhalb der CLEAs entwickelten García-García et al. [112] sogenannte FastPrep-CLEAs. Dabei wurden *N*-Acetyl-D-Neuraminsäurealdolase CLEAs, mit FastPrep, einem Zellaufschlussgerät, zerkleinert.

Die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) als „*proteic feeder*“ vereinfacht die Gewinnung von CLEAs, wenn der Proteingehalt in Enzympräparationen gering ist oder die Enzymaktivität anfällig ist, gegenüber den hohen Glutardialdehydkonzentrationen, die nötig sind, um Aggregate zu erhalten [113]. Shah et al. [113] stellten CLEAs einer Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und einer Penicillinacylase in Ab- und Anwesenheit von BSA her. In Abwesenheit von BSA konnte nur 0,4 % der Enzymaktivität erhalten werden, mit BSA dagegen 100 % [113]. Guauque Torres et al. [114] synthetisierten zunächst einen quervernetzten „*protein cofeeder*“-Kern aus BSA und immobilisierten dann darauf als äußere Schicht eine Lipase B von *Candida antarctica*.

Eine besonders interessante Anwendung der Methode ist die Kombination mehrerer unterschiedlicher Enzyme in einem CLEA. Solche Immobilisate werden als combi- oder multi-CLEAs bezeichnet. Dabei können Enzyme miteinander immobilisiert werden, die in einer multienzymatischen Reaktion ein Produkt synthetisieren oder Mehrzweckbiokatalysatoren mit mehreren Aktivitäten hergestellt werden.

Beispiele für den ersten Ansatz stellen die Arbeiten von Jung et al. [115] und Ning et al. [116] dar. Jung et al. [115] produzierten trienzymatische CLEAs aus Amylosucrase, Maltooligosyltrehalosesynthase und Maltooligosyltrehalosetrehalhydrase, mit denen sie in einer *one-pot*-Reaktion Trehalose aus Saccharose herstellen konnten. Ning et al. [116] stellten combi-CLEAs aus Ketoreductase und D-Glucosedehydrogenase her. Ihr Ziel war die *in situ* Kofaktorregenerierung während der Synthese chiraler Alkohole. Die combi-CLEAs waren besser geeignet als das native Enzymsystem.

Den zweiten Ansatz nutzten Dalal et al. [117] zur Herstellung eines Mehrzweckbiokatalysators mit Lipase,  $\alpha$ -Amylase und Phospholipase Aktivität; Ba et al. [118] nutzten ihn mit Laccase und Tyrosinase zur Herstellung eines Mehrzweckbiokatalysators für den Einsatz in der Aufarbeitung häuslicher Abwasser und Krankenhausabwässer.

Die weitere Entwicklung von CLEAs in den Jahren seit ihrer Vorstellungen beinhalten u. a. Spherezymes [119] und magnetische CLEAs [120].

### 3.1.4 Gemischte Methoden

Nicht immer führt die Anwendung einer der vorgestellten Immobilisierungsmethoden zu einer ausreichenden Stabilisierung bzw. Verbesserung der Eigenschaften des Enzyms. In solchen Fällen kann die Kombination mehrerer Methoden zum Erfolg führen.

Solche Ansätze wurden zum Beispiel von Wiemann et al. [121] und Scholz et al. [122] -Ummantelung adsorbierter Proteine mit Silikon, Roessl et al. [123] – Einschluss von CLEAs in Silica und Zwerenz und Jördening [124] – Einschluss von Bentonit adsorbierter Enzyme in Alginat - verfolgt.

### 3.1.5 Multienzymimmobilisierung

Das Zusammenwirken mehrerer Enzyme zum Erreichen des gewünschten Endprodukts ist ein Konzept, das in der Natur weit verbreitet ist. Die Schwierigkeiten, die damit verbunden sind, werden in der Natur häufig durch Multienzymkomplexe gelöst. Solche Komplexe können mit Hilfe der Gentechnik als Fusionsproteine erzeugt werden oder durch Co-Lokalisierung während der Immobilisierung. Dabei sind die Techniken, die zur Immobilisierung von einzelnen Enzymen eingesetzt werden, auch für die Co-Lokalisierung nutzbar [28]. Die gleichzeitige Immobilisierung von mehreren Enzymen ist keine neue Idee: so immobilisierten Srere et al. [125] bereits 1973 - zur Untersuchung der Oxalaacetatproduktion und -verwertung in den Mitochondrien - Malathydrogenase, Lactathydrogenase und Citratsynthase gemeinsam auf Sephadex G-50, Sepharose 4B und durch gemeinsamen Einschluss in einem Polyacrylamidgel. Ebenfalls von Mitochondrien inspiriert, entwickelten Zhang et al. [126] etliche Jahre später ein Multienzymsystem aus einem Polydopaminmikrokapselgerüst und räumlich getrennter  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase und Glucosidase. Die Enzyme wurden im Innern der Kapsel oder in der Wand eingeschlossen und chemisch auf die Oberfläche der Mikrokapseln gebunden. Das System produzierte erfolgreich Isomaltooligosaccharide aus Stärke. Die räumliche Trennung von Enzymen in mehreren Kompartimenten eines Mikropartikels wurde auch von Bäumler und Georgieva [127] erfolgreich umgesetzt. Kreft et al. [128] entwickelten eine Methode zur Herstellung von mikrometergroßen „Schale-in-Schale“-Polyelektrolytkapseln, die zur Immobilisierung von mehreren kooperierenden Enzymen genutzt werden kann. Trägerunabhängige Immobilisierungskonzepte für mehrere Enzyme wurden bereits im vorangegangenen Kapitel vorgestellt.

## 3.2 Prozessgestaltung/Prozessführung

Wie im vorangegangenen Kapitel besprochen, ermöglicht die Immobilisierung von Enzymen eine größere Flexibilität bei der Auswahl von Reaktoren und Prozessoperationen. So ist die Nutzung von Fest- oder Fließbettreaktoren nur mit trägergebundenem Enzym möglich [129]. Immobilisierte Enzyme können in einer großen Vielzahl verschiedener Reaktortypen eingesetzt werden [58]. Zu den derzeit verwendeten Enzymreaktoren gehören diskontinuierliche oder kontinuierliche Rührkessel sowie kontinuierliche Festbett-, Wirbelschicht- und Ultrafiltrationsmembranreaktoren. Enzymreaktoren mit immobilisierten Enzymen haben Vorteile, wie hohe Enzymbeladungen, erhöhte Enzymproduktivität, die Möglichkeit Produkte zu recyceln, hohe Flussraten, eine Reduktion von Kosten, Energie und Abfallprodukten, einfaches *Scale-Up* in größere Systeme und hohe Erträge reiner Materials. Die Automatisierung des Prozesses führt zu einer bedeutenden Kostenreduktion [130].

### 3.2.1 Reaktorauswahl

Für enzymatische Reaktionen stehen verschiedene Reaktoren, jeweils mit spezifischen Vor- und Nachteilen zur Verfügung. Aspekte, die bei der Auswahl in Betracht gezogen werden müssen, sind:

Kosten, Raum, Massentransport, Kinetiken, Heizen und Kühlen, Bedienungsfreundlichkeit, und Wiederverwendbarkeit des Katalysators [47].

Festbettreaktoren sind sehr einfach aufgebaut. Sie bestehen aus einer Säule, die mit trägerfixiertem Biokatalysator gefüllt ist und kontinuierlich von der flüssigen Phase durchströmt wird [6]. Zu den Vorteilen von Festbettreaktoren gehört, dass die Zwischenräume gering sind und dadurch hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erreichbar sind [131]. Weitere Vorteile sind geringe Investitionskosten, geringer mechanischer Stress und eine mögliche Verringerung von Nebenreaktionen durch kürzere Verweilzeiten [132]. Andererseits hat die Hydrodynamik in einem Festbettreaktor, charakterisiert durch Pfropfenströmung, Auswirkungen. So kommt es zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten von Substrat und Produkt. Als Konsequenz ist die Nutzung bei hohen  $K_M$ -Werten und Produktinhibierung von Vorteil, aber bei geringen  $K_M$ -Werten und Substratinhibierung der Katalysatoren problematisch. Zusätzlich kann der pH-Wert während eines einzelnen Durchflusses durch das Bett nicht angepasst werden. Das pH/Aktivitätsprofil des Enzyms muss weit genug sein, um die möglichen pH-Wertveränderungen ausgleichen zu können [131]. Weitere Punkte, die beim Betrieb von Festbettreaktoren sorgfältig kontrolliert oder vermieden werden müssen, sind: interne und externe Massentransportlimitierungen, Kanalbildung, Druckabfälle bei kleineren Partikeln oder hohen Flussraten, Wassergehalt und Fouling des Enzymbetts während des Prozesses [133].

In Wirbelschichtreaktoren wird die Substratlösung vom unteren Ende des Bettes zugeführt mit einer Geschwindigkeit, die hoch genug ist, um den Biokatalysator anzuheben. Solche Reaktoren sind dann besonders wertvoll, wenn die Substratlösung partikuläres Material enthält. Der Massentransport in einer Wirbelschicht ist besser als in einem Festbett [134]. Wirbelschichtreaktoren sind von Vorteil: bei kleineren Partikeln, die in Festbettreaktoren einen hohen Strömungswiderstand erzeugen; zur Minimierung von internen oder externen Massentransportlimitierungen; oder wenn eine weitere Phase (wie Gas, unlösliche Reaktanten oder sekundäre organische Phase) vorhanden ist. Wirbelschichtreaktoren eignen sich auch für größere Partikel, wenn der Einsatz von gerührten Tankreaktoren nicht sinnvoll ist [47] sowie bei viskosen oder partikulären Substraten [135].

Ein Rührreaktor (stirred tank reactor (STR)) ist aufgrund seiner Einfachheit, Flexibilität und gut durchmischten Hydrodynamik der am weitesten verbreitete Reaktor [136]. Er kann für Reaktionen mit löslichen oder immobilisierten Enzymen eingesetzt werden und eignet sich im kontinuierlichen Betrieb auch für enzymatische Reaktionen mit Substratinhibierung [132]. Bei diesem Reaktortyp kann es allerdings durch Rühren zu mechanischen Schäden am Biokatalysator kommen, mit einer daraus folgenden Abnahme der Aktivität mit der Zeit. Damit wird eine Anpassung der Betriebsbedingungen (z. B.: Erhöhung der Verweilzeit) nötig oder die Zugabe von Biokatalysator in den Reaktor während der Reaktion [53].

### **3.2.2 Prozessführung/Betriebsart**

Prozesse bzw. Reaktoren können absatzweise (batch), unter Zufütterung (fed-batch) oder kontinuierlich (continuous) betrieben werden. Im Batchmodus werden alle Reagenzien gemeinsam in den Reaktor gegeben und das Produkt nach Abschluss der Reaktion gewonnen. Der Umsatz im Reaktor ist eine Funktion der Batchdauer. Im Fall starker Substratinhibierung des Biokatalysators ist diese Arbeitsweise nicht geeignet. In diesen Fällen kann der Prozess entweder kontinuierlich oder im Zufütterungsmodus betrieben werden. Im Zufütterungsmodus wird periodisch (oder kontinuierlich) Substrat in den Reaktor zugegeben, während sich das Produkt bis zum Ende der Reaktion ansammelt.



Bei kontinuierlicher Arbeitsweise werden die Reagenzien kontinuierlich in den Reaktor geführt und Produkte kontinuierlich entnommen.

In biokatalytischen Prozessen wird die Betriebsweise meist durch Reaktionscharakteristika wie Kinetik, inhibitorische Effekte, thermodynamische Gleichgewichte und Wasserlöslichkeit von Substraten und Produkten bestimmt [53]. Für Prozesse im Industriemaßstab werden kontinuierliche Reaktoren tendenziell diskontinuierlichen vorgezogen.

In gut durchmischten Reaktoren kann bis zu 10 % des Volumens von festem Biokatalysator eingenommen werden, ohne dass es zu Schäden durch Rührer oder andere Partikeln kommt. Wird der Katalysator in Form eines Bettes gepackt, kann bis zu 66 % des Volumens Katalysator sein. Das kann bedeutende Auswirkungen auf die Raum-Zeit-Ausbeute dieser Reaktoren haben [137]. Festbettreaktoren, die sich wie Pfropfenströmungsreaktoren verhalten, werden am häufigsten für immobilisierte Enzymreaktionen genutzt [47].

### 3.2.3 ISPR

In ihrer natürlichen Umgebung arbeiten Enzyme in der Regel bei Substrat- und Produktkonzentrationen im mg/L Bereich. Im Großmaßstab arbeiten sie also sehr weit entfernt von ihren natürlichen Bedingungen, was Konsequenzen für ihre Stabilität und Aktivität hat [53]. Bei hohen Produktkonzentrationen kommt es bei Enzymen häufig zu Produktinhibierung, die Reaktionsgeschwindigkeit verringert sich. Aus diesem Grund kann es sinnvoll sein, das Produkt während der Reaktion zu entfernen – sogenannte *in situ* Produktentfernung (*in situ product removal* (ISPR)). Dies kann sowohl intern, im gleichen Reaktor, als auch extern, in einem zusätzlichen Reaktor, stattfinden [47]. ISPR ermöglicht es, thermodynamisch ungünstige Reaktionen in Richtung des gewünschten Produkts zu verschieben und die Anzahl der Aufarbeitungsschritte zu verringern [138]. Der Einsatz bietet sich außerdem an, wenn es sich bei dem gewünschten Produkt um ein Intermediat handelt [139].

Viele Reaktionen, wie beispielsweise Oligosaccharidsynthesen, müssen aufgrund ungünstiger Reaktionsgleichgewichte bei höheren Substrat- als Produktkonzentrationen stattfinden, um das Gleichgewicht in Richtung Produktbildung zu verschieben. Die Abtrennungstechniken, die in diesen Fällen genutzt werden, müssen selbstverständlich eine hohe Selektivität bei der Bindung des Produkts und eine niedrige unspezifische Bindung des Substrats aufweisen [140]. Zu den Abtrennungstechniken gehören: Evaporation über Vakuumfermentation; Gas-Stripping (Ausblasen); Pervaporation; Extraktion in eine andere Phase; grö ßenselektive Permeation, basierend auf Membrandialyse; reversible Komplexbildung; Produktimmobilisierung über Adsorption oder spezifische Bindung [141].

Beispiele für die Möglichkeiten der ISPR in der Biokatalyse stellen die Arbeiten von García-García et al. [142], Zhang et al. [143], Berensmeier und Buchholz [144], Sun et al. [145] und Waluga und Scholl [139] dar. Bei Lye und Woodley [140] finden sich zusätzlich mehrere Beispiele für industrielle ISPR-Anwendungen.

### 3.2.4 Multienzymatische Prozesse

Multienzymatische Prozesse werden nach Santacoloma et al. [9] in *in vivo* und *ex vivo* Prozesse eingeteilt. Also eine Einteilung in eine Kombination enzymatischer Reaktionen, die innerhalb (*in vivo*) bzw. außerhalb einer Zelle (*ex vivo*) stattfinden. Zu den Vorteilen der Durchführung multienzymatischer Reaktionen außerhalb einer Zelle gehören eine stark reduzierte Komplexität des

Systems sowie eine verbesserte Kontrolle und Optimierung durch Veränderung von Enzymkonzentrationen und Bedingungen. Außerdem besteht die Möglichkeit unter Bedingungen zu arbeiten, die für die Zelle toxisch wären. Weitere Vorteile sind weniger Nebenreaktionen und eine sich daraus ergebende höhere Konzentration und größere Reinheit des Produkts sowie eine Reduzierung der Down-Stream-Processing Schritte [132].

Multienzymatische Synthesen und Prozesse können mit Hilfe nativer Enzyme (z. B.: [38]), getrennt immobilisierter Enzyme (z. B.: [146]) oder auch gemeinsam immobilisierter Enzyme (siehe Multienzymimmobilisierung) umgesetzt werden.

Multienzymatische Prozesse können in einem oder mehreren Reaktoren durchgeführt werden. In der Theorie gibt es für eine  $n$ -Schritt multienzymatische Reaktion  $2^{n-1}$  mögliche Prozesse. In multienzymatischen Prozessen können Enzyme aus verschiedenen Wirtsorganismen zum Einsatz kommen. Dadurch ist es möglich, dass sich die Enzyme hinsichtlich ihrer optimalen Temperaturen, pH-Werte und anderer Bedingungen stark unterscheiden. Noch wichtiger ist, dass sie keine ähnlichen Reaktionsraten bei ähnlichen Konzentrationen der Reaktanten aufweisen. In solchen Fällen kann eine Trennung der Kaskade in verschiedene Gruppen angebracht sein [132].

In dem am häufigsten umgesetzten *one-pot*-Konzept sind die Intermediate gleichzeitig Produkt einer Reaktion und Substrat einer anderen. Daher ist ihre Konzentration normalerweise gering und Produkt- und Substratinhibierungen der beteiligten Enzyme können verringert sein [9].

Beispiele für multienzymatische *one-pot*-Reaktionen mit ihren Produkten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1 Beispiele für multienzymatische *one-pot*-Reaktionen mit ihren Produkten.**

Artikel	Anzahl beteiligter Enzyme	Produkt	Besonderheiten
[147]	2	N-Acetylneuraminsäure	
[148]	2	enantiomerenreine Epoxide	mit ISPR
[35]	2	N-Acetylneuraminsäure	
[30]	4	dGMP	
[149]	3	L-Phenylglycin	
[36]	3	Nukleotidzucker	
[33]	4	$\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1-3)-2-Acetamido-2-Deoxy-D-galactose	
[150]	3	Uridin 5-Diphosphatglucuronsäure; UDP-galacturonsäure	
[31]	2 bzw. 3	Amylose	
[37]	3	2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose	
[151]	3	5-Fluoro-5-deoxy-D-ribose	
[152]	3	UDP-Galactose, UDP-Glucose und Derivate	
[34]	2	Oxalacetat	Kombination von mesophilen und thermophilen Enzymen

Artikel	Anzahl beteiligter Enzyme	Produkt	Besonderheiten
[39]	3	Laminaribiose	Grundlage der vorliegenden Arbeit
[38]	3	Cellobiose	
[32]	5	Desoxythymidindiphosphatzucker	
[153]	2	Isomaltose	

Die Entwicklung, Optimierung und Kontrolle eines komplexen multienzymatischen Prozesses ist eine große Herausforderung. Da mehrere katalytische Schritte komplexere Abhängigkeiten der Prozessvariablen bedeuten, wird der Einsatz mathematischer Modelle und Simulationen als Werkzeug für Prozessanalyse und Optimierung essentiell [9]. Im folgenden Kapitel soll auf diese Werkzeuge eingegangen werden.

### 3.3 Werkzeuge für die Prozessentwicklung

Bioprozessentwicklungsprobleme sind häufig multivariant/multidimensional und komplex [154]. Die Entwicklung eines (multi-)enzymatischen Prozesses ist daher sehr aufwendig und macht den Einsatz von Methoden wie statistischer Versuchsplanung und mathematischen Modellen und Simulationen sinnvoll.

#### 3.3.1 Statistische Versuchsplanung

Die erste Voraussetzung bei der Entwicklung eines (multi-)enzymatischen Prozesses ist eine gute Kenntnis der Eigenschaften des Enzyms bzw. der beteiligten Enzyme. Bei der Untersuchung von Prozessen oder Systemen, hier beispielsweise der Charakterisierung der Enzyme, gibt es zwei prinzipielle Vorgehensweisen, um den Einfluss von Einflussgrößen/Parametern auf das System zu untersuchen:

1. die „ein Faktor nach dem anderen Methode“ bei der der zu untersuchende Parameter variiert wird, während alle anderen Parameter konstant gehalten werden und dies dann für die restlichen Parameter wiederholt wird
2. die statistische Versuchsplanung, bei der die Parameter nach festgelegten Versuchsplänen gleichzeitig variiert werden.

Bei der statistischen Versuchsplanung werden abhängig vom Ziel (Screening, Optimierung usw.) unterschiedliche Versuchspläne genutzt (vgl. [155]). Zu den Stärken der statistischen Versuchsplanung gehört, dass sie auch den Einfluss der Parameterbeziehungen zueinander auf die Systemantwort aufdeckt. Diese Beziehungen zueinander lassen sich mit anderen Methoden oft schwer aufdecken und interpretieren [156].

Die Wirkungsflächenanalyse oder im Englischen *Response Surface Methodology* (RSM) ist eine Sammlung mathematischer und statistischer Techniken. Sie sind für die Modellierung und Analyse von Problemen nützlich, bei denen die Systemantwort (z. B. Produktbildung) von verschiedenen Variablen beeinflusst wird und das Ziel die Optimierung dieser Antwort ist [157]. Die RSM definiert die Effekte der unabhängigen Parameter, allein oder in Kombination, auf den Prozess. Zusätzlich zur Analyse der Effekte der unabhängigen Variablen erzeugt die Methode ein mathematisches Modell, das die Systemantwort in Abhängigkeit der unabhängigen Parameter beschreibt:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad (1)$$

Dabei ist  $\eta$  die Systemantwort,  $x$  sind die unabhängigen Parameter,  $n$  die Zahl der unabhängigen Parameter und  $\varepsilon$  ist der statistische Fehler, der andere Variabilitätsquellen repräsentiert, die nicht von  $f$  beschrieben werden. Die graphische Darstellung des mathematischen Modells führte zu dem Namen *Response Surface Methodology* [158]. Die Parameter (Faktoren) werden auf mindestens zwei unterschiedlichen Leveln (Stufen) untersucht. Diese werden kodiert (z.B: +/-, -1/1, 1/2) angegeben [155]. Die Kodierung ermöglicht die Untersuchung der Parameter in verschiedenen Größenordnungen, ohne dass dabei der größere die Untersuchung des kleineren beeinflusst [159].

Nach Bezerra et al. [159] lässt sich die Anwendung der RSM in die folgenden Schritte unterteilen:

1. Auswahl der unabhängigen Parameter und Abgrenzung der experimentellen Region
2. Auswahl des Versuchsplans und Durchführung der Experimente
3. mathematisch-statistische Auswertung der erhaltenen experimentellen Daten durch den Fit an eine Polynomfunktion
4. Bewertung der Eignung des Modells
5. Prüfung der Notwendigkeit und Möglichkeit einer Verschiebung in Richtung der optimalen Region
6. Gewinnung optimaler Werte der untersuchten Variablen.

In fast allen Fällen wird als Modellgleichung eine lineare Gleichung:

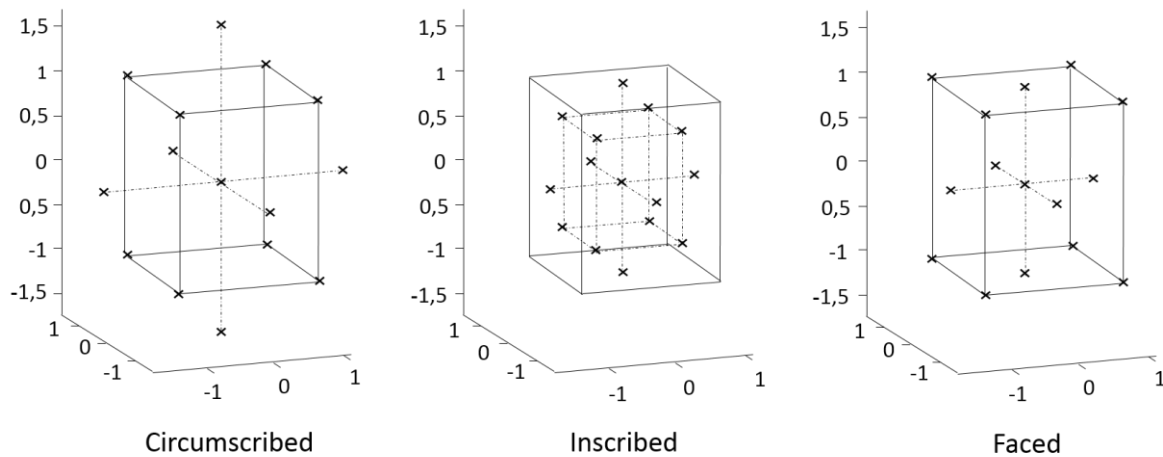
$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2)$$

oder eine quadratische Gleichung:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

genutzt [157]. Dabei sind  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  und  $\beta_{ii}$  Regressionskoeffizienten und  $x_i$  und  $x_j$  kodierte, unabhängige Parameter [158].

Häufig genutzte Versuchspläne in der RSM sind zentral zusammengesetzte Versuchspläne oder im Englischen *Central Composite Designs* (CCDs) [u. a. [160], [161], [162], [163], [164], [165]]. *Central Composite Designs* verbinden einen Zwei-Level-voll-oder teilfaktoriellen Versuchsplan mit zusätzlichen Axial- oder Sternpunkten und mindestens einem Punkt im Zentrum der untersuchten experimentellen Region [166]. Die Zentral- und Sternpunkte erlauben das Abschätzen der Effekte zweiter Ordnung. Es gibt drei Typen von *Central Composite Designs*: *Circumscribed* (CCC), *inscribed* (CCI) und *Faced* (CCF) (siehe Abbildung 2) [167]. Bei einem *Circumscribed Design* befinden sich die Sternpunkte außerhalb des Würfels, bei einem *Inscribed Design* wird ein CCC im Würfel platziert und bei einem *Faced Design* liegen die Sternpunkte auf den Oberflächen des Würfels. Die Sternpunkte entstehen durch Variation der einzelnen Faktoren, ausgehend vom Zentralpunkt [155]. Nach Prasad et al. [167] ist die Genauigkeit der Abschätzung in einem CCC über den gesamten Versuchsraum gut, bei einem CCI in einem Teilgebiet um den Zentralpunkt und bei einem CCF angemessen über den gesamten Versuchsraum, aber schlecht für rein quadratische Koeffizienten.



**Abbildung 2** Geometrie der zentral zusammengesetzten Versuchspläne bei drei Einflussfaktoren. Nach [167]. Die Eckpunkte der Würfel sind die Versuchspunkte des vollfaktoriellen Versuchsplans.

Weitere häufig genutzte Versuchspläne zur Bestimmung von *Response Surfaces* sind *Full* und *Fractorial Design*, Box-Behnken, Doehlert und *Mixture Designs* [166].

Mit Hilfe einer Varianzanalyse, im Englischen *Analysis of Variance* (ANOVA), werden die Versuchsergebnisse und Modelle statistisch ausgewertet.

### 3.3.2 Mathematische Modelle: Kinetik, Modellierung und Simulation

Da die Durchführung von Experimenten, besonders beim Scale-Up, teuer und zeitaufwendig ist, können Prozessmodellierungen und Simulationen eine effiziente Beurteilung verschiedener Prozessmöglichkeiten erlauben [136]. Prozessmodelle und kinetische Modelle ermöglichen eine quantitative Beschreibung des Prozesses [53]. Solche Modelle sind für den industriellen Einsatz eines Biokatalysators von signifikanter Bedeutung. Die wichtigsten Charakteristika von Enzymen sind die Grunddaten der Kinetik der katalysierten Prozesse und das Wissen um Faktoren, die diese kinetischen Eigenschaften beeinflussen [168].

#### 3.3.2.1 Kinetik

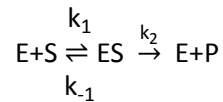
Zur Bestimmung von Enzymkinetiken werden die Anfangsgeschwindigkeiten unter optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt. Die Parameter der kinetischen Modelle können durch Fitten der kinetischen Daten mit Hilfe (nicht) linearer Regression identifiziert werden [47].

Ein korrekter Fit aller Anfangsgeschwindigkeitsdaten garantiert allerdings nicht, dass das kinetische Modell zu den Gesamtreaktionsdaten passt. Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeitsgleichung muss die Reaktionsrate als Funktion aller relevanten Komponenten bei allen relevanten Konzentrationslevels beschreiben. Ein guter Fit der Zeitverläufe einiger Batchreaktorexperimente bei verschiedenen Startkonzentrationen stellt einen geeigneten Test der Geschwindigkeitsgleichung dar. Das bedeutet, dass die numerische Integration der Geschwindigkeitsgleichung (beispielsweise durch die Runge-Kutta-Methode), die einen simulierten Zeitverlauf ergibt, über den gesamten Bereich der Umwandlung an die Daten der gemessenen Zeitverläufe passen muss. Eine Kombination der Runge-Kutta-Methode und Methoden nicht-linearer Regression erlaubt die Identifikation von Parametern aus den Zeitverlaufsdaten. Diese Technik beginnt mit einem Set gegebener Parameter, führt die numerische Integration der Geschwindigkeitsgleichung durch und vergleicht den simulierten mit dem gemessenen

Zeitverlauf. Anschließend werden die Parameter verändert und die gleichen Schritte werden wiederholt, bis die Simulation zu den gemessenen Daten passt [47].

### 3.3.2.1.1 Enzymkinetik nach Michaelis-Menten

Die Michaelis-Menten Gleichung ist die grundlegende Gleichung der Enzymkinetik [169]. Ihre Grundlage ist die folgende Reaktionssequenz:



Dabei wird das Substrat (S) über reversible Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) in das Produkt (P) umgewandelt, wobei das Enzym (E) wieder freigesetzt wird. Unter Annahme des Fließgleichgewichts lässt sich, über die Massenbilanzen der Reaktionskomponenten sowie die Geschwindigkeitskonstanten, die Michaelis-Menten-Gleichung ableiten:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{mit} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{und} \quad v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (4)$$

Diese beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (S), der Maximalgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) und der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ). Bei  $E_0$  handelt es sich um die Ausgangskonzentration des Enzyms [170].

Ausgehend vom grundlegenden Formalismus der Michaelis-Menten-Gleichung wurde eine Vielzahl neuer kinetischer Modelle für Multi-Substrat-Multi-Produktreaktionen und Enzyminhibierungen entwickelt ([169], [132]), aber auch für reversible Reaktionen wie die Glucose-Fructose-Isomerisierung von Glucoseisomerase. In diesem Fall lässt sich die Reaktionsrate der Reaktion nach dem reversiblen modifizierten Michaelis-Menten-Mechanismus mit:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [\bar{G}]}{K_M + [\bar{G}]} \quad \text{mit} \quad [\bar{G}] = [G] - [G]_e \quad (5)$$

beschreiben, wobei  $[G]_e$  die Konzentration von Glucose im Gleichgewicht ist [171].

### 3.3.2.1.2 Enzyminhibitoren

Ein Inhibitor ist eine Substanz, die reversibel mit einem Enzym interagiert und sein katalytisches Potenzial verringert. Dabei wird unterschieden zwischen

- kompetitiven Inhibitoren, die den ersten Schritt der Katalyse, die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum, beeinflussen, ohne dabei in die Umsetzung des Substrats im aktiven Zentrum einzugreifen;
- nicht kompetitiven Inhibitoren, die den ersten und zweiten Schritt der Katalyse, die chemische Umsetzung des gebundenen Substrats im aktiven Zentrum, beeinflussen, ohne dabei die Substratbindung zu beeinflussen;
- gemischte Inhibitoren, die beide Schritte beeinflussen;
- unkompetitive Inhibitoren, die erst nach Bindung des Substrats an den Komplex binden können [168].

Die kompetitive Hemmung kann wie folgt als modifizierte Michaelis-Menten Gleichung angegeben werden:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (6)$$

wobei [I] die Konzentration des Inhibitors darstellt und  $K_I$  die Dissoziationskonstante des Inhibitors [172]. Handelt es sich bei dem Inhibitor um das Produkt, spricht man von Produkthemmung. Sie ist ein Sonderfall der kompetitiven Hemmung [173]. Beispiele für kompetitive Enzymhemmung können in den Arbeiten von Grigorenko et al. [174] - Hemmung von  $\beta$ -Lactamase durch eine acylierte Phenoxyanillinverbindung - und Hara et al. [175] - Hemmung einer menschlichen Aldoketoreduktase durch gesättigte und cis-ungesättigte Fettsäuren - gefunden werden.

Nicht-kompetitive Hemmung kann auf zwei Arten erfolgen: die Bindung des Hemmstoffes an das Enzym mit der Dissoziationskonstante ( $K_{ic}$ ) und an den Enzymsubstratkomplex mit der Dissoziationskonstante  $K_{iu}$ . Erfolgt die Bindung unabhängig voneinander ( $K_{ic} = K_{iu}$ ) gilt:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{([S] + [K_M]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)} \quad (7)$$

Beeinflussen sie sich allerdings gegenseitig gilt:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) + [K_M] \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)} \quad (8)$$

[173]. Beispiele für nicht-kompetitive Hemmungen sind in Arbeiten von Chintakrindi et al. [176], Singh und Bhattacharyya [177] und Díaz-Sánchez et al. [178] zu finden.

Die Geschwindigkeitsgleichung der unkompetitiven Hemmung, bei der der Inhibitor nur an den Enzym-Substrat-Komplex bindet, lautet:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[K_M] + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \quad (9)$$

[172]. Handelt es sich bei dem Inhibitor um das Substrat, wird [I] durch die Konzentration des Substrats [S] ersetzt. Beispiele für Enzyme, die unkompetitiv durch Inhibitoren oder ihr Substrat gehemmt werden, sind:  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase [179],  $\beta$ -Glucosidase [180] und Tyrosinase [181].

### 3.3.2.1.3 Mehrsubstratreaktionen

Die Reaktionsmechanismen für Mehrsubstratreaktionen werden in zwei Kategorien eingeteilt:

1. Ping-Pong- Mechanismen, bei denen bereits Produkt gebildet wird bevor alle Substrate an das Enzym gebunden haben, und
2. Sequentielle Reaktionsmechanismen, bei denen alle Substrate binden müssen bevor es zur Reaktion kommt.

Sequentielle Reaktionsmechanismen werden, abhängig davon, ob es eine festgelegte Reihenfolge gibt, nach der die Substrate an das Enzym binden, nochmals in geordnete und zufällige Mechanismen unterteilt [168]. 1963 wurde von Cleland [182] eine Nomenklatur und Kurzschreibweise für die

Diskussion von Enzymmechanismen mit mehr als einem Substrat oder Produkt vorgeschlagen, die heute noch verwendet wird. Gemäß dieser werden:

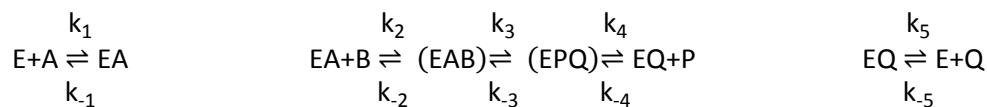
- Substrate in der Reihenfolge, in der sie an das Enzym (E) binden, mit A, B, C, D bezeichnet, Produkte in der Reihenfolge, in der sie vom Enzym freigesetzt werden, mit P, Q, R, S. Stabile Enzymformen werden E, F, G, H genannt, wobei E die am wenigsten komplexe oder freie Enzymform beschreibt
- Übergangskomplexe gemäß ihrer Zusammensetzung z. B. als EA, EAB oder EP bezeichnet
- Übergangskomplexe, die keine Substrate oder Produkte mehr binden können und an denen die katalytische Reaktion stattfindet, werden als zentrale Komplexe bezeichnet und in Klammern gesetzt, z. B. (EAB) oder (EAB-EPQ).
- die Anzahl der Substrate und Produkte mit den Vorsilben uni, bi, ter, quad angegeben.

Reagieren zwei Substrate zu zwei Produkten, handelt es sich um eine bi-bi-Reaktion, reagiert ein Substrat zu zwei Produkten spricht man von einer uni-bi-Reaktion.

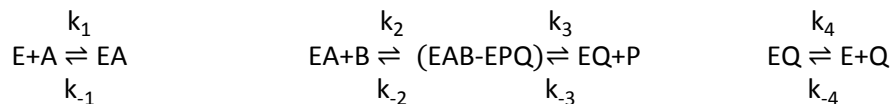
Hier soll nur auf den sequentiell geordneten bi-bi-Mechanismus und den Ping-Pong bi-bi-Mechanismus näher eingegangen werden.

### Sequentiell geordneter bi-bi-Mechanismus

Das Schema einer geordneten bi-bi-Reaktion kann wie folgt angegeben werden [182]:



bzw. mit nur einem Zentralkomplex:



Die Geschwindigkeitsgleichung kann nach dem Verfahren von King und Altman [183] über Differentialgleichungen hergeleitet werden und ergibt nach der Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten die folgende Gleichung:

$$v = v_{\max} \frac{[A] \cdot [B]}{K_{IA} \cdot K_B + [A] \cdot K_B + [B] \cdot K_A + [A] \cdot [B]} \quad (10)$$

Die Michaelis-Konstanten der verschiedenen Komponenten werden mit K und einem der Komponente entsprechenden Index versehen.  $K_{IA}$ ,  $K_A$  werden als Inhibierungs- bzw. Dissoziationskonstanten verwendet.

### Ping-Pong bi-bi-Mechanismus

Reaktionen nach dem Ping-Pong Mechanismus (alternativ *displacement* Mechanismus) laufen nach folgendem Schema ab:





Nach Dissoziation des Produktes P liegt das Enzym in einer stabilen, aber von der ursprünglichen Enzymform abweichenden Konformation (F) vor und ist nur in dieser Konformation in der Lage das Substrat B zu binden.

Die dazugehörige Geschwindigkeitsgleichung lautet:

$$v = v_{\max} \frac{[A] \cdot [B]}{K_A \cdot [B] + K_B \cdot [A] + [A] \cdot [B]} \quad (11)$$

[168], [182], [173], [169].

Bei Enzymen, die auf porösen partikulären Trägern immobilisiert werden, kann die Kinetik durch Diffusionseffekte modifiziert werden und ist damit eine Funktion der Partikelgröße. Der Reaktor enthält zu jedem Zeitpunkt eine Mischung von Enzymen mit verschiedenen apparenten  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Werten. Das übergreifende kinetische Verhalten des Reaktors summiert sich aus all diesen Beiträgen zur Reaktion. Jede Veränderung in der Partikelgrößenverteilung im Reaktor kann zu Veränderungen im kinetischen Verhalten des Reaktors führen [184]. Bei der kovalenten Immobilisierung über verschiedene Aminogruppen ergeben sich ebenfalls verschiedene apparente kinetische Eigenschaften durch unterschiedliche Exposition der katalytischen Zentren [86].

### 3.4 Eingesetzte Enzyme

Zur trienzymatischen Produktion von Laminaribiose aus Saccharose sind zwei Phosphorylasen und eine Isomerase nötig. Phosphorylasen sind eine Enzymklasse, die Glycosylverbindungen phosphoryliert und Zucker-1-phosphate bildet. Da ihre Reaktionen reversibel und hoch stereospezifisch sind, wird erwartet, dass sie praktische Katalysatoren zur Produktion bestimmter Oligosaccharide sind. Der Großteil der Phosphorylasen phosphorylieren  $\alpha$ - oder  $\beta$ -D-Glucoside zur Produktion von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -D-Glucose-1-phosphaten mit anomerer Retention oder Inversion [185].

#### 3.4.1 Sucrocephosphorylase

Sucrocephosphorylase (EC 2.4.1.7) katalysiert eine Reihe von Glycosyltransferreaktionen wie zum Beispiel  $\text{Saccharose} + P_i = \alpha\text{-D-Glucose-1-phosphat} + \text{D-Fructose}$  [186]. Die Reaktion ist reversibel [187].

Sucrocephosphorylasen wurden beispielsweise aus *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Pseudomonas saccharophila* isoliert und charakterisiert [31]. In dieser Arbeit wurde eine Sucrocephosphorylase aus *Leuconostoc mesenteroides* verwendet. Laut Koga et al. [188] handelt es sich um ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, das aus 488 Aminosäuren besteht und einen isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 hat.

Sucrocephosphorylase (EC 2.4.1.7) wurde früher als Glycosyltransferase klassifiziert, gehört aber zur Glycosidhydrolase Familie 13 (GH13), und folgt dem typischen *double displacement* Mechanismus der erhaltenden Glycosidasen [189], [104], [190]. Bei den zwei strukturell invertierenden Schritten des *double displacement* Mechanismus/ Ping-Pong-Mechanismus handelt es sich bei SP um: die Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoffbindung des Glycosyldonors und Bildung eines kovalenten  $\beta$ -Glycosylenzymintermediats; und die Reaktion des Intermediats mit Phosphat unter Bildung von  $\alpha$ -Glucose-1-phosphat [191], [192], [193].

Das  $\beta$ -Glycosylenzymintermediat kann an drei verschiedenen Reaktionstypen teilnehmen: der bereits erwähnten Reaktion mit Phosphat (Phosphorolyse), einer Reaktion mit Wasser (Hydrolyse) und einer

Reaktion mit einem externen Nukleophil (Transglycosylierung) [194]. Die hydrolytische Umwandlung von Saccharose ist irreversibel, läuft aber fast zwei Größenordnungen langsamer ab als die phosphorolytische Reaktion [186]. Das Enzym besitzt zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen: eine „Wasser“-Stelle, an der die Reaktion mit Wasser stattfindet, und eine „Akzeptorstelle“, an der das Enzym mit Phosphat und Zuckerakzeptoren, aber auch trans-1,2-Cyclohexandiol oder Ethylenglykol reagiert [191].

Bei der Sucrosephosphorylase aus *Bifidobacterium adolescentis* sind drei saure Aminosäuren am katalytischen Zentrum beteiligt: Asp-192, Glu-232, Asp-290. Diese drei Aminosäuren sind in der GH13 Familie stark konserviert. Die katalytischen Schlüsselaminosäuren in *Bifidobacterium adolescentis* Asp-192 und Glu-232 entsprechen Asp-196 und Glu-237 in *Leuconostoc mesenteroides* [195]. Die Reaktion wird initiiert durch gleichzeitige Protonierung der glykosidischen Bindung von Saccharose durch den Protonen Donor Glu-232 und einen nukleophilen Angriff von Asp-192 am anomeren Kohlenstoff der Glucoseeinheit. Dadurch kommt es zu einem kovalenten Substrat-Enzym-Intermediat und der Freisetzung von Fructose. Das Intermediat kann anschließend mit Dihydrogen oder Hydrogenphosphat ( $\text{HPO}_4^{2-}$  oder  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) reagieren, wobei Glucose-1-phosphat freigesetzt wird [196]. Unterstützt wird der vorgeschlagene Mechanismus von Mutations- [197], [190], [198] und Kristallstrukturstudien [196].

Die Einsatzmöglichkeiten von Sucrosephosphorylase sind vielfältig. So wurde es bereits zur Herstellung von  $\alpha$ -Glucose-1-phosphat [192], synthetischer Amylose [31] und in multienzymatischen Reaktionen zur Produktion von Sacchariden [39], [38] genutzt. Industriell wird die Transglykosylierungsreaktion zur Herstellung von Glycoin® (2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-sn-glycerol) genutzt. Dabei reagiert das  $\beta$ -Glycosylenzymintermediat mit Glycerin [199].

Um den Einsatz zu verbessern, wurde Sucrosephosphorylase auf verschiedenste Weise immobilisiert, darunter auf porösem Amino-Silicat [191] und porösen Keramikperlen [200], als CLEA [104], [189] und auf Sepabeads EC-HFA und Sepabeads EC-EP [201] sowie Eupergit C [193].

### 3.4.2 Laminaribiosephosphorylase

Laminaribiosephosphorylase [( $\beta$ -1,3-oligoglucan : orthophosphate glucosyltransferase) (EC. 2.4.1.31)], ist eine Dissaccharidphosphorylase, die reversibel die Reaktion Glucose + Glucose-1-phosphat = Laminaribiose + Phosphat katalysiert [202]. Da Laminaribiose und höhere Oligosaccharide ebenfalls als Glycosylakzeptor dienen können, kommt es zur Bildung von Laminaritriose und höheren Oligosacchariden [203], [202].

Laminaribiosephosphorylase wurde zuerst von Maréchal und Goldemberg [202] in der Alge *Euglena gracilis* und dem Protozoen *Astasia ocellata* [204] entdeckt. In *Euglena gracilis* beschrieb Maréchal [205] zusätzlich eine  $\beta$ -1,3-Oligoglucanphosphorylase, die die gleiche Reaktion wie Laminaribiosephosphorylase katalysiert, aber verstärkt höhere Oligosaccharide bildet. In Bakterien wurde Laminaribiosephosphorylase 2012 von Kitaoka et al. [206] in *Paenibacillus* sp. YM-1 und Nihira et al. [207] in *Acholeoplasma laidlawii* gefunden und ihre Gene in *E. coli* kloniert.

In dieser Arbeit wird die Laminaribiosephosphorylase von *E. gracilis* genutzt. Dort kommt das Enzym in drei Isoformen vor, die sich leicht in ihren isoelektrischen Punkten (4,65-4,90) und thermischen Stabilitäten unterscheiden [203]. Kitaoka et al. [203] geben einen optimalen pH-Wert von 7,2 an, Maréchal und Goldemberg [202] einen von 6,5. Das Enzym hat eine molekulare Masse von 100 kDa auf SDS-PAGE und 200 kDa auf Gelfiltrationsbasis, was auf eine dimere Struktur hindeutet [203].

Laminaribiosephosphorylase wird als Glycosidhydrolase klassifiziert und gehört zur Familie GH94 [206]. Diese besteht hauptsächlich aus invertierenden Phosphorylasen, die  $\beta$ -Glucoside angreifen und  $\alpha$ -Glucose-1-phosphat produzieren [208].

Die Reaktion kann mit einem sequentiellen bi-bi-Mechanismus beschrieben werden, wobei Glucose-1-phosphat vor Glucose bindet. Die Synthesereaktion wird bei hoher Glucosekonzentration inhibiert [203]. Es kommt nicht zur Bildung eines Glycosylenzymintermediats, die Reaktion erfolgt nach einem *single displacement* Mechanismus [209].

Laminaribiosephosphorylase aus *E. gracilis* wurde als Extrakt zusammen mit Sucrosephosphorylase zur *in vitro*-Synthese von 1,3- $\beta$ -D-Glucanen [210] und zur Produktion von Laminarioligosacchariden aus Glucose und Glucose-1-phosphat [211] sowie als reines Enzym zur multienzymatischen Produktion von Laminaribiose [39] genutzt.

### 3.4.3 Glucoseisomerase

D-Glucose/Xyloseisomerase (EC 5.3.1.5) gehört, neben Amylasen und Proteasen, zu den im größten Maßstab hergestellten Enzymen. Sie katalysiert die reversible Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose bzw. D-Xylose zu D-Xylulose [212]. Das thermodynamische Gleichgewicht des Fructose/Glucose-Verhältnisses erhöht sich mit der Temperatur [213].

Glucoseisomerase ist in Prokaryonten weit verbreitet [212]. In dieser Arbeit wird eine kommerziell erhältliche Glucoseisomerase aus *Streptomyces murinus* (Sweetzyme® IT Extra) eingesetzt. Industriell werden unter anderem Glucoseisomerasen aus *Bacillus coagulans*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces rubiginosus* und *Streptomyces phaeochromogenes* zur Herstellung von *High Fructose Corn Sirup* genutzt. Die Temperaturen liegen dabei zwischen 50-60 °C und die pH-Werte zwischen 7,5-8 [24]. Neben der Nutzung in der HFCS-Herstellung kann Glucoseisomerase auch in der Ethanolherstellung zur Isomerisierung von Xylose zu Xylulose genutzt werden und erhält in der Forschung dafür viel Aufmerksamkeit ([214], [51], [215], [216], [217]). Typische Einsatzbedingungen sind in dem Fall Temperaturen von 30-35 °C und pH-Werte zwischen 4-5 [214].

Glucoseisomerase aus *Streptomyces murinus* ist ein Tetramer. Jedes seiner Monomere (388 Aminosäuren, 42 770 Da) besteht aus einer Domäne, die als 8-strängiges  $\alpha/\beta$ -Fass gefaltet ist, und dem C-Terminus, der um den Barrel eines anderen Monomers geschlungen ist und dadurch ein Dimer formt. Zwei solcher Dimere bilden die tetramere Struktur [218]. Das Enzym benötigt zweiwertige Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Co^{2+}$  als Cofaktoren [212]. Bei der Glucoseisomerase aus *Streptomyces murinus* befinden sich pro Monomer zwei Metallionen in der Nähe des C-terminalen Endes der  $\beta$ -Stränge und der nachfolgenden Loops [218]. Die Metallionen sind am Mechanismus der Isomerisierung beteiligt. Dabei wird nach der Ringöffnung, von  $Mg^{2+}$  eine Hydridverschiebung vom C2- auf das C1-Atom (Glucose  $\rightarrow$  Fructose) des Zuckers katalysiert, anschließend der Ring geschlossen und das Produkt freigesetzt [219]. Die Kinetik der Glucoseisomerase lässt sich mit der Michaelis-Menten-Kinetik für reversible Reaktionen beschreiben [220].

Glucoseisomerase wurde bereits auf unterschiedlichsten Trägern wie Eupergit C 250 L, DEAE Cellulose, Polyacrylamidgel, Alginatperlen [80], Gelatinematrizen [221] immobilisiert. Sweetzyme IT Extra wird vermutlich wie Sweetzyme T immobilisiert: Dabei wird nach Aufschluss von *Streptomyces murinus* mit Glutardialdehyd quervernetzt, die Komplexe werden ausgeflockt, extrudiert und getrocknet [222].

## 4 Material und Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien, wie Enzyme und Organismen, sowie Geräte und Chemikalien aufgeführt. Im Anschluss werden die Methoden zur Kultivierung, Immobilisierung und Analyse beschrieben.

### 4.1 Material

Die Enzyme mit Ursprungsorganismus und Bezugsquelle sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Laminaribiosephosphorylase wurde aus Flüssigkulturen von *Euglena gracilis* aufkonzentriert (siehe Kapitel Aufkonzentrierung von Laminaribiosephosphorylase).

**Tabelle 2** Verwendete Enzyme mit Ursprungsorganismus und Bezugsquelle.

Enzym (Organismus)	Bezugsquelle
Laminaribiosephosphorylase ( <i>Euglena gracilis</i> Wildtyp Stamm Z)	SAG Göttingen ( <i>Euglena gracilis</i> )
Sucrosephosphorylase ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	Bitop AG
Glucoseisomerase nativ ( <i>Streptomyces murinus</i> )	Novozyme
Glucoseisomerase immobilisiert ( <i>Streptomyces murinus</i> )	Sigma Aldrich

Die verwendeten Geräte und wichtige Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 3** Verwendete Geräte mit Hersteller und Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller	Typ/Nummer
Autoklav	Systec	V-150
HPAEC	Diverse	System: Dionex ICS-3000 Pumpe: Sykam S 2100 Solvent Autosampler: Spark Holland Basic Marathon GT0198 Detektor: Dionex PAD-2 Vorsäule: Thermo Scientific CarboPac PA1 Carbohydrate Column BioLC™ Säule: Thermo Scientific CarboPac PA1 Carbohydrate Column Begasung: Helium
HPLC	Diverse	Pumpe: LC-9A (Shimadzu) Degaser: DG-1210 Uniflows Ltd. (Degasys) Detektor: RI-101 (Shodex) Säulenofen: ThermoSphere TS-130 (Phenomenex) Autosampler: 816 Spark Holland B.V. Säule: Sugar SC 1011 (8 x 300 mm) (Shodex)
Nanodrop	ThermoScientific	NanoDrop 2000
Reinstwasseranlage	Millipore	MilliQ Gradient A10
Rotator	Labor-Brand	Modell 28000

Gerät	Hersteller	Typ/Nummer
Sterilbank	Heraeus	Laminair HLB 2448
Thermoschüttler	HTA-BioTec HLC HLC	CTM 2 HTMR-131 MHR 23
Ultraschallgerät	Bandelin	Sonoplus
Ultraschallsonotrode	Bandelin	MS-72
Waagen	Sartorius Sartorius	AZ214 LC 6200D
Wärmeschrank	Memmert	B10
Zentrifugen	Beckman Coulter Thermo Scientific Eppendorf	Avanti J-E Fresco 21 5804R

**Tabelle 4** Verwendete Materialien mit Bezugsquelle und Typenbezeichnung.

Materialien	Bezugsquelle	Typ
Immobilisierungsmaterialien	Resindion Lifetech Lifetech	Sepabeads EC-EP/S Purolite ECR8209 M Purolite ECR8309 M
Membranfilter	Merck Millipore	GSWP, 0,22 µm
Dialyseschlauch	Serva	VISKING Dialyseschlauch 27/32, MWCO 14 kDa

Mit Ausnahme der Chemikalien in Tabelle 5 wurden alle Chemikalien von Carl Roth bezogen.

**Tabelle 5** Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquelle.

Chemikalie	Bezugsquelle
Laminaribiose	Megazyme
Laminaritriose	Megazyme
Chitosan	Sigma-Aldrich
Glucose-1-phosphat	Sigma-Aldrich
NaOH 50 %	Sigma-Aldrich
Natriumpolyphosphat	Acros Organics

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Kultivierung von *Euglena gracilis*

Die Alge wurde in Flüssigkultur bei 29 °C mit Licht in einem Schüttelinkubator (120 UpM) kultiviert. Die Anzucht von Vorkulturen und die Stammhaltung erfolgte in 100 mL Flüssigkeit in 250 mL Kolben, die Zellproduktion in 1 L Flüssigkeit in 2 L Kolben. Die Zusammensetzung des Flüssigmediums ist in Tabelle 6 aufgeführt. Zu seiner Herstellung wurde Reinstwasser genutzt.

**Tabelle 6** Zusammensetzung des Flüssigmediums zur Kultivierung von *Euglena gracilis*.

Mediumsbestandteil	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	2
Pepton	5
Glucose	15
Vitamin B12	10·10 <sup>-6</sup>

Es wurde eine Glucosestammlösung angesetzt, die getrennt von den restlichen Medienbestandteilen autoklaviert wurde und erst bei Beimpfung zugegeben wurde. Vitamin B12 wurde ebenfalls als Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und bei der Beimpfung hinzugegeben. Beimpft wurde mit 5 % des Medienvolumens.

Zur Stammhaltung und Überprüfung auf Kontaminationen wurde 200 µL Flüssigkultur auf Agarplatten ausgestrichen und auf der Fensterbank inkubiert. Die Zusammensetzung des Agarmediums ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7 Zusammensetzung des Agarmediums zur Kultivierung von *Euglena gracilis*.**

Mediumsbestandteil	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	3
Pepton	15
Glucose	1
NaCl	6
Agar	12

#### 4.2.2 Aufkonzentrierung von Laminaribiosephosphorylase

Laminaribiosephosphorylase wurde aus Flüssigkultur aufkonzentriert. Dazu wurde die Kultur bei 4 °C mit 10 000 g für 10 min zentrifugiert. Jeweils 2 g des Zellpellets wurde in 10 mL 0,1 M TrisHCl Puffer (pH 7,2) gelöst. Die gelösten Zellen wurden mit Hilfe von Ultraschall unter Eiskühlung aufgeschlossen (2 x 3,5 min, 50 % Intervall, 72 % Leistung). Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4 °C, mit 17 000 g für 40 min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Laminaribiosephosphorylase mit Hilfe einer Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert. Zum Ausfällen wurde fein gemörseretes Ammoniumsulfat unter Rühren und Eiskühlung langsam, bis zu einer Sättigung von 30 %, zum Überstand zugegeben. Um eine vollständige Lösung des Ammoniumsulfats sicher zu stellen, wurde die Lösung anschließend 1 h gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch 30 min Zentrifugation bei 4 °C mit 25 000 g entfernt. Dem Überstand wurde weiteres Ammoniumsulfat, bis zu einer Sättigung von 60 %, zugegeben, wiederum 1 h gerührt und 30 min bei 4 °C mit 25 000 g zentrifugiert. Die Laminaribiosephosphorylase befindet sich im Pellet. Dieses wurde in Puffer gelöst und anschließend das Ammoniumsulfat mit Hilfe einer Dialyse mit dem gleichen Puffer entfernt. Die wichtigsten Puffer und ihre Anwendung sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Dialyse mit hochmolarem Puffer (>0,05 M) wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle anderen wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Puffer wurde nach 10 min, 1 h, 12 h und 14 h gewechselt.

**Tabelle 8 Übersicht über verwendete Puffer zur Lösung und Dialyse von aufkonzentriertem *Euglena gracilis* Extrakt und ihre Verwendung.**

Anwendung	Natriumphosphatpuffer	
	Molarität [M]	pH-Wert [-]
Nativ	0,01	6,2
Immobilisierung auf Sepabeads	1	7,0
Immobilisierung auf Aldehydträgern (Purolite)	0,01	6,2
Immobilisierung auf Epoxyträgern (Purolite)	1	6,6

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch mit einem NanoDrop 2000 mit der A280 Methode bestimmt. Das aufkonzentrierte Enzym wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

Mit der beschriebenen Methode kann nur eine Aufkonzentrierung, nicht aber eine Aufreinigung des Enzyms erreicht werden. In dieser Arbeit wird die Proteinsuspension, der Verständlichkeit halber, als Laminaribiosephosphorylase bezeichnet.

### 4.2.3 Bestimmung der Enzymaktivität (Aktivitätstest)

Zur Bestimmung der Aktivität der nativen oder immobilisierten Enzyme werden diese zu einer gepufferten Substratlösung zugegeben und auf einem Thermoschüttler inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten werden Proben entnommen, die sofort durch Erhitzen bei 100 °C auf einem Thermoschüttler inaktiviert werden. Der Nachweis der Produkte, Substrate und Intermediate findet über HPLC oder HPAEC statt. Die Aktivität wird über Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Produktbildung ermittelt. Genaue Angaben zu den durchgeführten Aktivitätstests finden sich bei der Beschreibung des jeweiligen Versuchs.

### 4.2.4 Zuckernalytik

#### 4.2.4.1 High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC)

Alle Substrate und Produkte des trienzymatischen Systems, mit Ausnahme von Phosphat, konnten mit Hilfe einer ICS 3000 mit einem gepulsten amperometrischen Detektor (PAD-2) bei 25 °C nachgewiesen werden.

Die chromatographische Trennung erfolgte mit Gradient auf einer CarboPac PA1 Vorsäule und Hauptsäule bei einer Flussrate von 1 mL/min. Als Eluenten wurden A: 0,1 M NaOH; B: 0,1 M NaOH mit 1 M NaAcetat und C: 1 M NaOH eingesetzt. Die Gradienten zur Trennung aller Zuckerkomponenten, von Glucose und Fructose und zur Säulenregeneration sind in Tabelle 9 bis Tabelle 11 zu finden. Es wurde 10 µL Probe injiziert.

**Tabelle 9 HPAEC-Gradienten für Trennung und Nachweis von Glucose, Fructose, Saccharose, Laminaribiose, Laminaritriose, Glucose-1-phosphat**

Schritt-Nr.	Dauer [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [mL/min]
0	-	100	0	0,1
1	0,1	100	0	1
2	6,3	100	0	1
3	9,7	80	20	1
4	20	100	0	1
5	5	100	0	1
6	0,5	100	0	0,1

**Tabelle 10 HPAEC-Gradienten für Trennung und Nachweis von Glucose und Fructose.**

Schritt-Nr.	Dauer [min]	Eluent A [%]	Fluss [mL/min]
0	-	100	0,1
1	1	100	1
2	8	100	1
3	1	100	0,1

**Tabelle 11 HPAEC Gradient zur Säulenregeneration**

Schritt-Nr.	Dauer [min]	Eluent A [%]	Eluent C [%]	Fluss [mL/min]
0	-	100	0	0,1
1	1	100	0	1

Schritt-Nr.	Dauer [min]	Eluent A [%]	Eluent C [%]	Fluss [mL/min]
2	60	0	100	1
3	60	0	100	1
4	60	100	0	1
5	10	100	0	1
6	1	100	0	1
7	999	100	0	0,1

#### 4.2.4.2 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Glucose, Fructose und Saccharose bzw. Laminaribiose konnten zusätzlich mit HPLC nachgewiesen werden. Da die Disaccharide nicht voneinander getrennt werden konnten, wurde der Nachweis nur für den Zuckernachweis monoenzymatischer Aktivitätstests genutzt.

Die Trennung erfolgte isokratisch bei 80 °C auf einer Shodex SC1011 Säule mit MilliQ-Wasser als Eluent bei einer Flussrate von 0,6 mL/min, der Nachweis bei 30 °C mit einem Brechungsindexdetektor RI-101 (Showa Denko, Tokyo, Japan). Es wurde 100 µL Probe injiziert.

#### 4.2.5 Immobilisierungsmethoden

Nach der Immobilisierung und Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Enzyme wurde die Aktivität mit der des nativen Enzyms unter den gleichen Bedingungen verglichen.

##### 4.2.5.1 Crosslinking mit Dextranaldehyd und Glutardialdehyd

Da Dextranaldehyd nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es zunächst, wie bei Mateo et al. [56] beschrieben, synthetisiert. Zur Synthese wurde Dextran von *Leuconostoc mesenteroides* ( $M_r \sim 200$  kDa) verwendet. Nach der Dialyse waren ca. 63 mL wässrige Lösung vorhanden, die als Crosslinker eingesetzt wurden.

**Fällung:** 0,5 mL Enzym [gelöst in und dialysiert mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)] wurde mit 0,5 mL 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) verdünnt. Nach Zugabe von 0,39 g fein gemörstertem Ammoniumsulfat wurde der Ansatz für 1 h auf einem Rotator inkubiert.

**Crosslinking:** Für die Quervernetzung mit Dextranaldehyd wurde 0,5 mL der Dextranaldehydlösung hinzugegeben. Die Quervernetzung mit Glutardialdehyd erfolgte mit einem Glutardialdehyd:Proteinverhältnis von 0,17. Nach Zugabe des Crosslinkers wurde 2 h auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit 21 000 g für 5 min abzentrifugiert und dreimal mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen.

**Aktivitätsbestimmung bei 37 °C:** Zu den gewaschenen CLEAs wurde 2 mL 0,075 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,2 mol/L Glucose zugegeben. Es wurde nach 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min Probe genommen.

##### 4.2.5.2 Adsorption an Bentonit

**Adsorption** Bentonit wurde im Verhältnis 3,5:1 (Bentonit:Proteinkonzentration) zu LP in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) zugegeben. Da auf diese Weise keine stabile Suspension entstand, wurden weitere 0,9 mL Puffer zugegeben. Die Mischung wurde 21 h bei 4 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C mit 12 000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.



**Aktivitätsbestimmung bei 42 °C:** Zu dem auf Bentonit adsorbierten Protein wurde 1,8 mL 0,025 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,3 mol/L Glucose in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) zugegeben und nach 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min Proben genommen.

#### **4.2.5.3 Einschluss von nativem Enzym in Chitosan**

**Einschluss:** Nach Herstellung einer 1,5 %igen Chitosanlösung in 1,5 % Essigsäure wurde der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf pH 6 angehoben. 3,2 mL der hergestellten Lösung wurden mit 0,8 mL LP [in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)] gemischt und mit Hilfe einer Spritze in eine 10 %ige Natriumpolyphosphatlösung (pH 6,2) getropft. Die entstandenen Perlen wurden 1 h in der Polyphosphatlösung gerührt.

**Aktivitätsbestimmung bei 42 °C:** 1,3 g der Immobilisate (entspricht 260 µL nativer Enzymlösung) wurden mit 4,74 mL 0,025 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,4 mol/L Glucose in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) versetzt und bei 42 °C inkubiert. Es wurde nach 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min Probe genommen.

#### **4.2.5.4 Einschluss von nativem Enzym in 2 % Agar**

**Einschluss:** Für den Einschluss in Agar wurde Enzym in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) verwendet. Dieses wurde in einem Thermoschüttler auf 42 °C erwärmt, während eine 4 %ige Agarlösung im Wärmeschrank (60 °C) abgekühlt wurde. In einer 3 mL Spritze wurde der warme Agar (ca. 45 °C) im Verhältnis 1:1 mit der warmen Enzymlösung gemischt. Im temperierten Wärmeschrank wurde das Agar-Enzymgemisch mit Hilfe einer Kanüle (0,55 x 25 mm) tropfenweise aus der Spritze gedrückt und die einzelnen Tropfen an einem Nylonfaden aufgehängt und ausgehärtet.

**Aktivitätsbestimmung bei 42 °C:** Zu den Immobilisaten (eingesetzte Menge entspricht 0,5 mL nativer LP) wurde 4,5 mL 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,4 mol/L Glucose in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) zugegeben. Nach 0, 1, 3, 5, 7, 10, 30, 60 min wurden Proben genommen.

#### **4.2.5.5 Kovalente Immobilisierung auf Eupergit C und Sepabeads EC-EP/S**

**Kovalente Immobilisierung:** Für die Immobilisierung auf Eupergit bzw. Sepabeads wurde LP in 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) verwendet. Im Fall von SP wurde die native Enzymlösung vor Immobilisierung mit 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) 1:1 verdünnt. Zur Immobilisierung wurde 1 mL Enzymlösung mit 0,1 g des Trägers versetzt. Nach 24 h Inkubation auf einem Rotator wurden die Immobilisate abfiltriert und dreimal mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Immobilisat abfiltriert.

**Aktivitätsbestimmung bei 42 °C/37 °C:** Das Immobilisat wurde zur Bestimmung der Aktivität mit 4 mL 0,075 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,2 mol/L Glucose in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) versetzt und nach 0, 20, 40, 60 und 120 min Probe genommen.

#### **4.2.6 Trienzymatisches System als Vorversuch zur Immobilisierung auf Sepabeads**

Die Reaktion wurde bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (1000 UpM) in einem 5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt. Über 8 h wurde stündlich eine Probe von 10 µL genommen und mit HPAEC analysiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12 Reaktionsansatz zur trienzymatischen Produktion von Laminaribiose (Beweis der Anwendbarkeit).**

Enzyme	Substrat
0,05 g SP-Sepabeads	4 mL 0,18 mol/L Saccharose [in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)]
0,1 g GI-Granulat	
0,1 g LP-Sepabeads	

#### 4.2.7 Optimierung der Immobilisierung von Laminaribiosephosphorylase auf Sepabeads

**pH-Wert:** Nach Ausfällung der Proteine mit 60 % Sättigung wurde jeweils 2 g des Pellets in 1 M Puffer mit pH 7, pH 7,5, pH 8 und pH 8,5 gelöst und eine Dialyse mit dem entsprechenden Puffer durchgeführt. 1 mL der dialysierten Enzymlösungen wurde zu 0,1 g Sepabeads zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Nachdem die Immobilisate fünfmal mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen wurden, wurde die Aktivität von 0,05 g der Sepabeads mit 2 mL 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat und 0,1 mol/L Glucose bei 37°C bestimmt. Nach 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min wurde jeweils 10 µL Probe genommen.

**Proteinkonzentration:** LP in 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) wurde 1:10, 1:7, 1:5 und 1:3 verdünnt und die Proteinkonzentration der Verdünnung bestimmt. 1 mL der Verdünnungen wurden jeweils mit 0,1 g Sepabeads auf einem Rotator für 24 h inkubiert, fünfmal mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen und die Aktivität analog zu den Versuchen zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses bestimmt.

#### 4.2.8 Charakterisierung der Enzyme auf Sepabeads

Mit Hilfe von *Response Surface Methodolgy* wurde der Einfluss des pH-Wertes, der Temperatur und der Molarität des Puffers auf die Enzymaktivität untersucht. Es wurde ein Versuchsplan beruhend auf einem *Central Composite Design (face-centered)* für 3 Faktoren mit 3 Ausprägungen pro Faktor und 3 Wiederholungen des Zentralspunkts erstellt. Tabelle 13 fasst die experimentellen Bedingungen der Versuche zusammen.

**Tabelle 13 Kodierte Level für pH, Puffermolarität und Temperatur im experimentellen Design. Bereich und Kodierung der untersuchten Parametern (pH, Puffermolarität, Temperatur) für die Charakterisierung von Laminaribiosephosphorylase, Sucrosephosphorylase und Glucoseisomerase.**

Level	LP			SP und GI		
	A pH-Wert [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]	A pH-Wert [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]
- 1	6	0,01	37	6	0,01	37
0	6,75	0,055	41	6,75	0,055	43,5
+1	7,5	0,1	45	7,5	0,1	50

Im Fall von LP und SP wurde jeweils 0,05 g Immobilisat in den Batchversuchen eingesetzt, im Fall von GI 0,04 g. Alle Versuche wurden mit 2 mL Substrat in Natriumphosphatpuffer (LP: 0,05 mol/L G1P und 0,05 mol/L Glu; SP: 0,2 mol/L Sac; GI: 0,2 mol/L Fru) durchgeführt.

Im Fall von SP wurde nach 10 min 0,05 mL Probe genommen. Die Glucose- und Fructosekonzentrationen wurden über HPAEC bestimmt und als Antwortvariablen eingesetzt.

Im Fall von GI wurde nach 10 und 60 min 0,05 mL Probe genommen. Die Glucose- und Fructosekonzentrationen wurden über HPAEC bestimmt und als Antwortvariablen eingesetzt.

Im Fall von LP wurde nach 30 min 0,05 mL Probe genommen. Um die Stabilität der Immobilisate in die Charakterisierung mit einzubeziehen, wurde für weitere 210 min inkubiert, bevor 1,5 mL des Substrates mit neuem Substrat ersetzt wurde. Nach 60 min Inkubationszeit wurde eine weitere Probe genommen. Durch die verlängerte Reaktionszeit sollte sichergestellt werden, dass die Laminaribiosekonzentration oberhalb des Detektionslimits liegt. Die Laminaribiosekonzentrationen in den Proben wurde als Antwortvariable verwendet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Design Expert® 10.0.1 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Die Daten wurden an ein Modell zweiter Ordnung (Gleichung (3)) gefittet. Die statistische Auswertung erfolgte über Varianzanalyse. Waren im Modell sehr insignifikante Modellterme enthalten, wurde das Modell reduziert, wenn es dadurch verbessert werden konnte.

#### 4.2.9 Festlegung trienzymatischer Bedingungen

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Enzyme zu ermitteln, wurden die Modellgleichungen gelöst. Tabelle 14 fasst die Ziele und Gewichtungen der Systemantworten zusammen.

**Tabelle 14 Gewichtung der Systemantworten des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung der pH, Puffemolaritäts und Temperatureffekte auf LP- und SP-Sepabeads und GI-Granulat.**

Enzym	Antwortvariable	Ziel	Gewichtung
LP	Laminaribiose nach 30 min (1. Verwendung)	Max	+
	Laminaribiose nach 60 min (2. Verwendung)	Max	++
SP	Fructose nach 10 min	Max	+
	Glucose nach 10 min	Min	++
GI	Glucose nach 10 min	Max	+
	Glucose nach 60 min	Max	++

#### 4.2.10 Versuch zur Anwendbarkeit trienzymatischer Bedingungen

Die Reaktion wurde im 2 mL Mikroreaktionsgefäß mit 0,054 g (0,6 U) LP, 0,01 g (0,6 U) GI und 0,043 g (0,4 U) SP und 1,8 mL 0,05 mol/L Saccharose, gelöst in 0,05 M Natriumphosphat (pH 6,3), auf einem Thermoschüttler (1000 UpM) bei 37 °C durchgeführt. Nach 0, 3,5 h, 5, 6 und 7 h wurde 25 µL Probe genommen.

Die Reaktion im diskontinuierlichen Reaktor (25 mL Reaktionsvolumen) wurde mit 0,8 g SP, 1,68 g LP und 1,40 g GI und 0,05 mol/L Saccharose, gelöst in 0,05 M Natriumphosphat (pH 6,3), durchgeführt. Die Saccharoselösung wurde vor Versuchsbeginn sterilfiltriert, der leere Reaktor autoklaviert. Der Reaktor wurde mit 700 UpM mit Hilfe eines Rührers gemischt. Die Temperierung auf 37 °C erfolgte über den Wärmemantel des Reaktors mit Hilfe eines Thermostats.

Nach 8 h wurden die Immobilisate gewaschen und die Reaktion mit neuem Substrat wiederholt.

#### 4.2.11 Versuch zur bienzymatischen Produktion von Laminaribiose mit Glucose als Cosubstrat

Zur Auswahl von Reaktionsbedingungen wurden die im Anhang dargestellten MatLab®-Programme genutzt. Die Reaktion wurde im 2 mL Reaktionsgefäß mit 0,035 g SP-Sepabeads (0,8 U) und 0,1 g LP-Sepabeads (0,9 U) mit 1,8 mL Substrat (0,2 mol/L Saccharose und 0,016 mol/L Glucose, gelöst in 0,05 M Na-P-Puffer (pH 6,2), auf einem Thermoschüttler (1000 UpM) bei 37 °C durchgeführt. Proben (15 µL) wurden nach 0, 80, 200, 300 und 530 min genommen. Die Konzentrationen der Substrate und (Zwischen-)Produkte wurde mit HPAEC bestimmt.

#### 4.2.12 Stabilität und Wiederverwendbarkeit von LP und SP (Sepabeads und native LP)

**Stabilität (native LP):** Enzymstocklösung [Enzym in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)] wurde bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6 und 8 h wurde jeweils 100 µL der Enzymlösung entnommen und ein Aktivitätstest mit 1,8 mL 0,075 mol/L G1P und 0,05 mol/L Glu durchgeführt [in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)]. Nach 0, 5, 10, 20, 30 und 55 min wurde jeweils 15 µL Probe genommen.

**Stabilität (LP-/SP-Sepabeads):** 0,04 g der Immobilisate wurden in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 37 °C für 0, 2, 4, 6 und 8 h inkubiert, bevor ihre Aktivität bestimmt wurde. Zur Bestimmung der Aktivität wurde 1,8 mL des Puffers mit 1,8 mL Substrat (LP: 0,075 mol/L G1P und 0,05 mol/L Glu; SP: 0,2 mol/L Sac) ersetzt. Nach 0, 5, 10, 20, 30 und 55 min wurde jeweils 15 µL Probe genommen.

**Wiederverwendbarkeit:** 0,05 g SP- oder LP-Immobilisate wurden über 5 h in Substratanwesenheit (LP: 0,075 mol/L G1P und 0,05 mol/L Glu; SP: 0,2 mol/L Sac) bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h wurde jeweils 15 µL Probe genommen. Anschließend wurde das Substrat durch Puffer ersetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

#### 4.2.13 Bestimmung der kinetischen Parameter von SP- und LP-Sepabeads

Alle Versuche wurden in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (1000 UpM) mit 0,05 g Immobilisat in 2 mL Substrat durchgeführt. Tabelle 15 enthält die Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von SP-Sepabeads; Tabelle 16 die für LP-Sepabeads.

Tabelle 15 Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von SP-Sepabeads.

Versuch	Saccharose [mol/L]
1	0,045
2	0,01
3	0,005
4	0,004
5	0,003
6	0,001
7	0,0005

**Tabelle 16 Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von LP-Sepabeads.**

Versuch	Glucose [mol/L]	Glucose-1-phosphat [mol/L]	Versuch	Glucose [mol/L]	Glucose-1-phosphat [mol/L]
1	0,3	0,001	1a	0,001	0,06
2	0,3	0,005	2a	0,01	0,06
3	0,3	0,015	3a	0,03	0,06
4	0,3	0,025	4a	0,06	0,06
5	0,3	0,05	5	0,08	0,06
			6	0,15	0,06

Bei SP-Sepabeads erfolgten die Probenahmen (20 µL) nach 0, 1, 3, 5, 15 und 45 min. Bei LP-Sepabeads nach 0, 5, 10, 20, 30 und 90 min. Die Versuche mit LP-Sepabeads wurden dreimal wiederholt.

Die mit HPAEC ermittelten Produkt- und Substratkonzentrationen wurden zur nicht linearen Regression mit ModelMaker 3 verwendet. Die Integration erfolgte nach der Runge-Kutta Methode. Zur iterativen Optimierung der Parameter wurde der Simplex Algorithmus verwendet. Neben den Konstanten der Kinetik wurden auch Startwerte als Parameter definiert und optimiert.

#### 4.2.14 Lagerung von LP-Sepabeads

Ein großer Ansatz LP-Sepabeads wurde in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 4 °C gelagert. Daraus wurde nach 0, 5, 11, 18, 26, 32, 39 und 50 Tagen jeweils 0,04 g Immobilisat entnommen und ihre Aktivität bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (1000 UpM) mit 2 mL 0,075 mol/L G1P und 0,05 mol/L Glu in Puffer. Die Probenahmen (15 µL) erfolgten nach 0, 5, 10, 20, 30 und 55 min.

#### 4.2.15 Einschluss von (LP-)Sepabeads in Agar und Agarose

Es wurde eine 3 und eine 4 %ige Agarlösung sowie eine 3, 4 und 5 % ige Agaroselösung hergestellt. Tabelle 17 fasst die zum Einschluss von Sepabeads getesteten Bedingungen in den Polymeren zusammen.

**Tabelle 17 Versuche zum Einschluss von Sepabeads in Agar und Agarose.**

Sepabeads [mg]	Agar/Agarose [%]
50	3
100	3
150	3
200	3
50	4
100	4
150	4
200	4
50	5 (nur Agarose)

Nachdem die entsprechende Menge Sepabeads mit 1 mL der Polymerlösung gemischt wurde, wurden die Suspensionen als Gele, mit einer Stärke von ca. 4 mm, auspolymerisiert. Die Gele wurden in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 4 mm geschnitten, die über Nacht in Bechergläsern in 50 mL 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei Raumtemperatur mit Magnetkern gerührt wurden.

Zum Test auf den Erhalt der Aktivität wurden 50 mg LP-Sepabeads in 3 mL 4 % Agar bzw. 1 mL 5 % Agarose eingeschlossen. Die Aktivität der LP-Sepabeads bzw. der eingeschlossenen LP-Sepabeads wurde mit 4 mL 0,08 mol/L G1P und Glu in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 37 °C bestimmt. Es wurden nach 0, 5, 10, 20, 30 und 55 min jeweils 15 µL Probe genommen und mit HPAEC analysiert.

#### 4.2.16 Optimierung des Feststoffgehaltes beim Einschluss von LP-Sepabeads in Chitosan

Aktive LP-Sepabeads wurden zu 1 mL 1,5 % Chitosan-1,5 % Essigsäurelösung (pH 4,75 – pH-Wert wurde mit NaOH angehoben) in den in Tabelle 18 aufgeführten Konzentrationen eingeschlossen:

**Tabelle 18** Getestete Feststoffgehalte zur Optimierung des Einschlusses von LP-Sepabeads in Chitosan.

%	g/mL
1	0,01
3	0,03
5	0,05
7	0,07
9	0,09
11	0,11

Dazu wurde die Sepabead-Chitosan-Suspension mit Hilfe einer Pipette in eine eisgekühlte 10 %ige Polyphosphatlösung (pH 6,5) getropft und die Perlen in dieser 20 min gerührt.

Die Laminaribioseproduktion in 1 h bei 35 °C von jeweils 0,3 g Hybridimmobilisaten wurde mit 2 mL 0,05 mol/L Glucose und 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) bestimmt. Die Laminaribioseproduktion wurde mit der Produktion von Laminaribiose der LP-Sepabeads unter den gleichen Bedingungen verglichen.

#### 4.2.17 Charakterisierung der LP-Hybridimmobilisate

Der Einfluss der Molarität und des pH-Wertes des Puffers sowie der Temperatur auf die Aktivität der LP-Hybridimmobilisate wurde mit Hilfe der *Response Surface Methodology* bestimmt. Der Versuchsplan für ein *Central Composite Design (face-centered)* mit 3 Faktoren und 3 Ausprägungen pro Faktor ist in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Tabelle 19** Kodierte Level für pH-Wert, Puffermolarität und Temperatur im experimentellen Design. Bereich und Kodierung der untersuchten Parameter (pH, Puffermolarität, Temperatur) für die Charakterisierung von Laminaribiosephosphorylase-Hybridimmobilisaten. Nach [223].

Level	A pH-Wert [-]	B Temperatur [°C]	C Molarität [°C]
-1	6	25	0,01
0	6,75	35	0,055
+1	7,5	45	0,1

Die Versuche wurden mit 0,3 g Hybridimmobilisaten in 2 mL Substrat (0,05 mol/L Glucose und Glucose-1-phosphat) durchgeführt. Nach 0 und 60 min wurde 15 µL Probe genommen und mit HPAEC analysiert. Nach der 60 min Probe wurde das Substrat mit Puffer, entsprechend des Versuchsplans, ausgetauscht und die Immobilisate in Puffer weiter inkubiert, wieder entsprechend des Versuchsplans. Die Hybridimmobilisate wurden an Tag 4 und Tag 7 erneut auf ihre Laminaribiose- und Laminaribioseproduktion hin untersucht. Die Laminaribiose und Laminaribiosekonzentrationen nach 60 min wurden als Antwortvariablen genutzt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Design Expert® 10.0.1

(Stat-Ease-Inc., Minneapolis, USA). Zur Bestimmung von Optimalbedingungen wurden die Modellgleichungen gelöst. Tabelle 20 fasst die Ziele und Gewichtungen der Systemantworten zusammen.

**Tabelle 20 Gewichtung der Systemantworten des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung der pH-, Puffermolaritäts- und Temperatureffekte auf LP-Hybridimmobilisate.**

Enzym	Antwortvariable	Ziel	Gewichtung
LP	Laminaribiose nach 60 min (Tag 1)	Max	+
	Laminaribiose nach 60 min (Tag 4)	Max	++
	Laminaribiose nach 60 min (Tag 7)	Max	+++
	Laminaritriose nach 60 min (Tag 1)	Min	+
	Laminaritriose nach 60 min (Tag 4)	Min	+
	Laminaritriose nach 60 min (Tag 7)	Min	+

#### **4.2.18 Nachweis der Anwendbarkeit bienzymatischer Bedingungen (Hybridimmobilisate)**

Für den Test der bienzymatischen Versuche wurden mono- und bienzymatische Hybridimmobilisate hergestellt. Zur Herstellung bienzymatischer Hybridimmobilisate wurden SP- und LP-Sepabeads im Verhältnis 1:1 und 1:3 gemischt und anschließend 3 %ige Hybridimmobilisate durch Einschluss der Sepabeads in Chitosan hergestellt. Die Herstellung der monoenzymatischen Hybridimmobilisate erfolgte durch Einschluss von nur SP- oder LP-Sepabeads.

Zum Test auf Laminaribioseproduktion wurden 0,4 g Hybridimmobilisate in 2 mL Substrat [0,2 mol/L Saccharose und 0,04 mol/L Glucose in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)] bei 35 °C inkubiert. Im Falle von monoenzymatischen Hybridimmobilisaten wurden 0,1 g SP- und 0,3 g LP-Hybridimmobilisate bzw. 0,2 g SP- und 0,2 g LP-Hybridimmobilisate eingewogen. Nach 0, 4, 7, 23, 31, 47 und 51 h wurde jeweils 15 µL Probe genommen und mit HPAEC auf Laminaribioseproduktion untersucht.

#### **4.2.19 Stabilität, Wiederverwendbarkeit und Lagerung von LP-Hybridimmobilisaten bei 35 °C**

Mit Hilfe der in Abbildung 3 dargestellten Immobilisierungsapparatur wurden LP-Hybridimmobilisate hergestellt. Bei der Immobilisierungsmethode handelt es sich um eine Methode, die dem Jet-Cutter Verfahren von Pruße et al. [224] sehr ähnlich ist. Dabei wird die Chitosan-Sepabead-Suspension am Ende des Metallzylinders mit Hilfe von Druckluft durch die Kapillaren gedrückt. Durch einen seitlichen Luftstrom wird der Fluidstrom in kleinere Segmente geschnitten. Die Oberflächenspannung führt dazu, dass die Segmente beim Fallen Kugelform annehmen. Die Größe der Perlen ist abhängig vom Fluidstrom durch die Kapillaren bzw. deren Durchmesser sowie dem Druck/der Geschwindigkeit des seitlichen Luftstroms, der den Fluidstrom schneidet. Die Kugeln fallen in eine gerührte, eisgekühlte 10 %ige Polyphosphatlösung (pH 6,5) in der sie weitere 20 min gerührt werden.

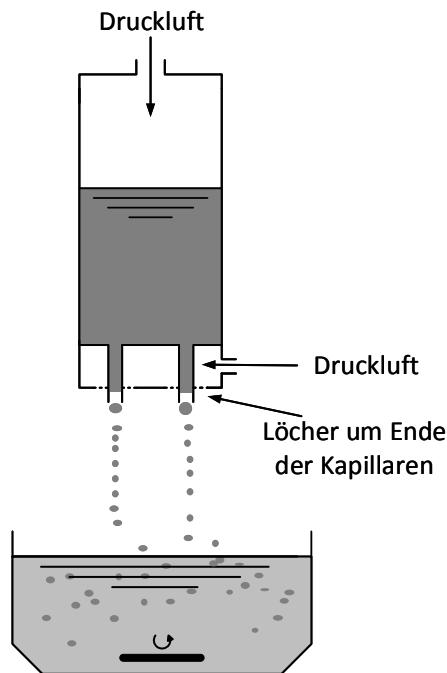


Abbildung 3 Immobilisierungsapparatur zur Herstellung von Hybridimmobilisaten. Nach [223].

**Stabilität:** Ansätze von 0,3 g Immobilisat wurden in 2 mL a) 0,05 M NaP-Puffer (pH 6) oder b) 0,25 mol/L Saccharose in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6) oder c) 0,25 mol/L Saccharose, 0,05 mol/L Fructose, 0,025 mol/L Glucose in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6) für 0, 25, 77, 99, 147, 190 und 241 h bei 35 °C inkubiert. Vor der Bestimmung der Aktivität wurden die Hybridimmobilisate dreimal für 10 min in 5 mL 0,05 M NaP-Puffer (pH 6) bei 4 °C auf einem Rotator gewaschen. Die Aktivität wurde mit 2 mL 87,5 mmol/L Glucose und 12,5 mmol/L Glucose-1-phosphat [in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6)] bestimmt. Nach 0, 5, 10, 20, 30, 55 und 60 min wurde 15 µL Probe genommen.

**Wiederverwendbarkeit:** 0,3 g LP-Hybridimmobilisate wurden zwölfmal in Aktivitätstests über 1 h eingesetzt. Das Waschen und die Bestimmung der Aktivität der Immobilisate erfolgten wie bereits für die Stabilitätsversuche beschrieben. Vor dem Aktivitätstest wurde das Gewicht der Hybridimmobilisate bestimmt und kaputte Perlen entfernt. Zwischen den Aktivitätstests wurden die Immobilisate bei 4 °C in Puffer gelagert.

**Lagerung:** Ein großer Batch LP-Hybridimmobilisate wurde in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6) bei 4 °C gelagert. Nach 0, 7, 14, 22, 30, 35, 43, 49, 58 und 64 Tagen wurden 0,3 g Immobilisate entnommen und ihre Aktivität, wie bereits für die Stabilitätsversuche beschrieben, bestimmt.

#### 4.2.20 Bestimmung der kinetischen Parameter von SP- und LP-Hybridimmobilisaten

Alle Versuche mit SP-Hybridimmobilisaten wurden in Natriumphosphatpuffer (pH 6) bei 35 °C auf einem Thermoschüttler (900 UpM) mit 0,2 g Immobilisat in 2 mL Substrat durchgeführt. Tabelle 21 enthält die Substratkonzentrationen für SP-Hybridimmobilisate. Alle Versuche mit LP-Hybridimmobilisaten wurden in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 37 °C durchgeführt. Tabelle 22 enthält die Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der LP-Hybridimmobilisate.



**Tabelle 21 Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von SP-Hybridimmobilisaten.**

Versuch	Saccharose [mol/L]	Phosphat [mol/L]	Versuch	Saccharose [mol/L]	Phosphat [mol/L]
1	0,01	0,05	1a	0,25	0,005
2	0,025	0,05	2a	0,25	0,01
3	0,075	0,05	3a	0,25	0,05
4	0,1	0,05	4a	0,25	0,15
5	0,15	0,05			

**Tabelle 22 Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von LP-Hybridimmobilisaten.**

Versuch	Glucose [mol/L]	Glucose-1-phosphat [mol/L]	Versuch	Glucose [mol/L]	Glucose-1-phosphat [mol/L]
1	0,3	0,001	1a	0,001	0,06
2	0,3	0,005	2a	0,01	0,06
3	0,3	0,015	3a	0,03	0,06
4	0,3	0,025	4a	0,06	0,06
5	0,3	0,04	5a	0,08	0,06
6	0,3	0,05	6a	0,15	0,06
7	0,3	0,075	7a	0,25	0,06

Bei SP-Hybridimmobilisaten erfolgte die Probenahme (20 µL) nach 0, 3, 5, 10, 15 und 60 min, bei LP-Hybridimmobilisaten nach 0, 5, 10, 20, 30 und 90 min. Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Die mit HPAEC ermittelten Produkt- und Substratkonzentrationen wurden zur nicht linearen Regression mit ModelMaker 3 verwendet. Die Integration erfolgte nach der Runge-Kutta Methode. Zur iterativen Optimierung der Parameter wurde der Simplexalgorithmus verwendet. Neben den Konstanten der Kinetik wurden auch Startwerte als Parameter definiert und optimiert.

#### **4.2.21 Bestimmung der kinetischen Parameter von bienzymatischen (SP, LP) Hybridimmobilisaten**

Zur Herstellung von bienzymatischen Hybridimmobilisaten wurden 0,22 g SP-Sepabeads mit 0,53 g LP-Sepabeads gemischt und zu 50 mL einer 1,5 %igen Chitosanlösung zugegeben. Die Herstellung der Immobilisate erfolgte wie im Kapitel „Stabilität, Wiederverwendbarkeit und Lagerung von LP-Hybridimmobilisaten bei 35 °C“ beschrieben. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden Aktivitätstests mit 0,2 g Immobilisat und 2 mL Substrat in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) bei 35 °C auf einem Thermoschüttler (900 UpM) durchgeführt. Tabelle 23 fasst die Konzentration der Substrate in den Versuchen zusammen. Die Probennahmen (20 µl) erfolgten nach 0, 5, 10, 15, 60, 120, 180 und 240 min.

**Tabelle 23 Substratkonzentrationen zur Bestimmung der kinetischen Parameter von bienzymatischen Hybridimmobilisaten.**

Versuch	Saccharose [mol/L]	Glucose [mol/L]
1	0,05	0,05
2	0,075	0,075
3	0,1	0,1
4	0,15	0,15
5	0,2	0,2
6	0,5	0,5

Die mit HPAEC ermittelten Produkt- und Substratkonzentrationen wurden zur nicht linearen Regression mit ModelMaker 3 verwendet. Die Integration erfolgte nach der Runge-Kutta Methode. Zur iterativen Optimierung der Parameter wurde der Simplex Algorithmus verwendet. Neben den Konstanten der Kinetik wurden auch Startwerte als Parameter definiert und optimiert.

#### 4.2.22 Optimierung der Immobilisierung auf Epoxyträgern (Purolite)

Zunächst wurde der pH-Wert des 1 M Immobilisierungspuffers optimiert: Dazu wurde die aufkonzentrierte LP in Natriumphosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (6; 6,3; 6,6 und 7) gelöst und anschließend auf den Trägern immobilisiert, die Aktivität der Träger und die Konzentration der gebundenen Proteine bestimmt.

Zur Immobilisierung wurde das Trägermaterial zunächst mit dem Puffer gewaschen, in dem das Enzym vorliegt. 1 g Trägermaterial wurde mit 4 mL Enzym gemischt, 18 h auf einem Rotator bei RT inkubiert und anschließend weitere 20 h bei RT in Ruhe inkubiert. Die Immobilisate wurden dreimal mit Immobilisierungspuffer und ein weiteres Mal mit Immobilisierungspuffer mit 0,5 M NaCl gewaschen. Die Lagerung der Immobilisate erfolgte bei 4 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3).

Vor Immobilisierung wurde SP 1:4 und GI 1:9 mit Immobilisierungspuffer verdünnt. Für die Immobilisierung wurde das Träger/Enzym-Verhältnis [ $\text{g}_{\text{Träger}}/\text{mL}_{\text{Enzym}}$ ] (SP: 1:1; 1:4; 1:7; 1:10; GI: 1:1; 1:2; 1:4) optimiert.

#### 4.2.23 Optimierung der Immobilisierung auf Aldehydträgern (Purolite)

Zur Immobilisierung wurde LP in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) genutzt. Vor Immobilisierung wurde SP 1:4 und GI 1:9 mit Immobilisierungspuffer [0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2)] verdünnt. Die Träger wurden zunächst mit Puffer gewaschen und anschließend 2 % Glutardialdehydlösung (mit Puffer von 25 % verdünnt) im Verhältnis 1:4 zugegeben. Die Suspension wurde 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert und danach gewaschen. Die Träger wurden mit Enzymlösung gemischt und 18 h auf dem Rotator bei RT inkubiert. Das Verhältnis von Enzym zu Träger wurde optimiert (Tabelle 24).

**Tabelle 24 Untersuchte Träger zu Enzym Verhältnisse zur Immobilisierung von Enzymen auf Aldehydträgern.**

Träger:SP	Träger:GI	Träger:LP
1:1	1:1	1:1
1:4	1:2	1:2,5
1:7	1:4	1:4
1:10		

Nach Inkubation wurden die Immobilisate dreimal mit Immobilisierungspuffer und ein weiteres Mal mit Immobilisierungspuffer mit 0,5 M NaCl gewaschen. Die Lagerung der Immobilisate erfolgte bei 4 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3).

#### 4.2.24 Charakterisierung von LP auf Epoxy und Aldehydträgern

Der Einfluss der Molarität und des pH-Wertes des Puffers sowie der Temperatur auf die Aktivität der LP-Epoxy und Aminoimmobilisate wurde mit Hilfe der *Response Surface Methodology* bestimmt. Der Versuchsplan für ein *Central Composite Design (face-centered)* mit drei Faktoren und drei Ausprägungen pro Faktor ist in Tabelle 25 zusammengefasst:

**Tabelle 25** Kodierte Level für pH, Puffermolarität und Temperatur im experimentellen Design. Bereich und Kodierung der untersuchten Parameter (pH, Puffermolarität, Temperatur) für die Charakterisierung von LP-Epoxy- und Aldehydimmobilisaten.

Level	A pH-Wert [-]	B Temperatur [°C]	C Molarität [M]
-1	6	37	0,01
0	6,75	41	0,055
+1	7,5	45	0,1

Die Versuche wurden jeweils mit 0,1 g Immobilisaten in 3 mL Substrat (0,06 mol/L Glu und 0,04 mol/L G1P) durchgeführt. Nach 0, 30, 60 und 120 min wurde 30 µL Probe genommen und mit HPAEC analysiert. Nach der 120 min Probe wurde 1,6 mL Überstand entnommen und durch neues Substrat ersetzt und nach 0 und 120 min weitere Proben genommen. Die Laminaribiose- und Laminartriosekonzentrationen wurden bei der Analyse der Daten mit Design Expert® 10.0.1 (Stat-Ease-Inc., Minneapolis, USA) als Antwortvariablen genutzt. Das weitere Vorgehen bei der Auswertung erfolgte wie bereits für Sepabeads beschrieben (Kapitel 4.2.8).

##### 4.2.24.1 Wiederverwendung von LP auf Epoxy- und Aldehydträgern und SP auf Epoxyträgern

Für die Versuche mit Epoxyimmobilisaten wurden die Substrate (SP: 0,045 mol/L Sac; LP 0,06 mol/L Glu und 0,04 mol/L G1P) in 0,025 M NaP-Puffer (pH 6) gelöst; für Versuche mit Aminoimmobilisaten in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6,1). Zur Bestimmung der Aktivität wurde zu 0,1 g Immobilisat 3 mL (LP) bzw. 4 mL (SP) Substrat zugegeben und bei 41 °C auf einem Thermoschüttler (900 UpM) inkubiert. Nach 0, 20, 30, 40, 50 und 60 min wurde 30 µL Probe genommen. Nach Ende des Aktivitätstest wurde das Substrat mit Puffer ersetzt und die Immobilisate bei 4 °C gelagert. Die Immobilisate wurden sechsmal wiederverwendet.

## 5 Ergebnisdiskussion

Eine Voraussetzung für die Entwicklung eines wirtschaftlichen multienzymatischen Produktionsprozesses für Laminaribiose ist die Immobilisierung der beteiligten Enzyme. In dieser Arbeit sollte eine Immobilisierungsmethode gefunden werden, die sich auch für eine kontinuierliche Produktion mit prozessintegrierter Adsorption eignet. Die Immobilisate sollten charakterisiert und der Einsatz der Immobilisate zur multienzymatischen Produktion von Laminaribiose getestet werden.

### 5.1 Screening von Immobilisierungsmethoden

Ziel der Immobilisierung von Enzymen ist u. a. eine Verbesserung ihrer mechanischen Stabilität, Wiederverwendbarkeit und eine Stabilisierung ihrer Aktivität. Allerdings hat eine Immobilisierung in der Regel nicht nur Vorteile. So ist eine verbesserte Stabilität häufig mit einer verringerten Aktivität verbunden.

Es wurden verschiedene Immobilisierungsmethoden auf ihre Eignung hin untersucht. Dabei war neben Aktivitätserhaltung und Wiederverwendbarkeit ein entscheidendes Kriterium, dass freie Proteine im Reaktionsraum verhindert werden, da der Kontakt des Adsorptionsmaterials mit Proteinen zu Schaumbildung führt.

Die Immobilisierungsmethoden wurden zunächst mit Laminaribiosephosphorylase (LP) getestet, da es das Schlüsselenzym des trienzymatischen Systems darstellt und aufgrund der Aufreinigung aus *E. gracilis* leicht nachproduziert werden konnte. Tabelle 26 gibt einen Überblick über die untersuchten Methoden und Materialien.

**Tabelle 26** Immobilisierungsmethoden und –materialien zur Immobilisierung von LP.

Methode	Material	Restaktivität [%]	Probleme
Quervernetzung	Glutardialdehyd	0	große Mengen freies Protein
	Dextranaldehyd	5	
Adsorption	Bentonit	75	
Einschluss	Chitosan	75	
	Agar	16	
Kovalente Fixierung	Eupergit C	27	nicht verfügbar
	Sepabeads EC-EP/S	65	
	ECR8209 M	30	
	ECR8309 M	16	

Außer bei der Quervernetzung mit Glutardialdehyd konnte bei allen Immobilisierungsmethoden ein Teil der Aktivität des nativen Enzyms erhalten werden. Bei der Quervernetzung mit Dextranaldehyd bleibt mit 5 % Restaktivität nur sehr wenig Aktivität erhalten. In Bezug auf den Erhalt von Aktivität sind die Adsorption auf Bentonit und der Einschluss in Chitosan die erfolgreichsten Immobilisierungsmethoden. Allerdings weisen die Überstände der Aktivitätstests mit Crosslinking-Quervernetzungs-/Adsorptions- und Einschlussimmobilisaten hohe Konzentrationen freien Proteins auf. Zudem verlieren die Immobilisate bei Wiederverwendung alle (Bentonit) oder große Teile ihrer Aktivität (Chitosan). Es kommt also nicht zu einer stabilen Immobilisierung des Enzyms. Beim Einschluss der LP in Agar bleibt deutlich weniger Aktivität (16 %) als beim Einschluss des Enzyms in Chitosan erhalten. Auch hier lässt sich freies Protein im Überstand detektieren.

Die kovalente Fixierung der LP verhindert durch stabile Bindung des Enzyms auf den Trägern dagegen effektiv, dass freie Proteine im Überstand vorkommen und ist somit die geeignete Methode.

Von den untersuchten Trägern tragen die ersten drei (Eupergit C, Sepabeads EC-EP/S, ECR8209 M) auf ihrer Oberfläche Epoxygruppen, als funktionelle Gruppen über die Proteine gebunden werden, während auf ECR8309 M Aminogruppen vorhanden sind, über die nach Aktivierung mit Glutardialdehyd Proteine kovalent gebunden werden. Aufgrund der Bindung über Glutardialdehyd wird der Träger nachfolgend auch als Aldehydträger bezeichnet und die mit Epoxygruppen funktionalisierten Träger als Epoxyträger.

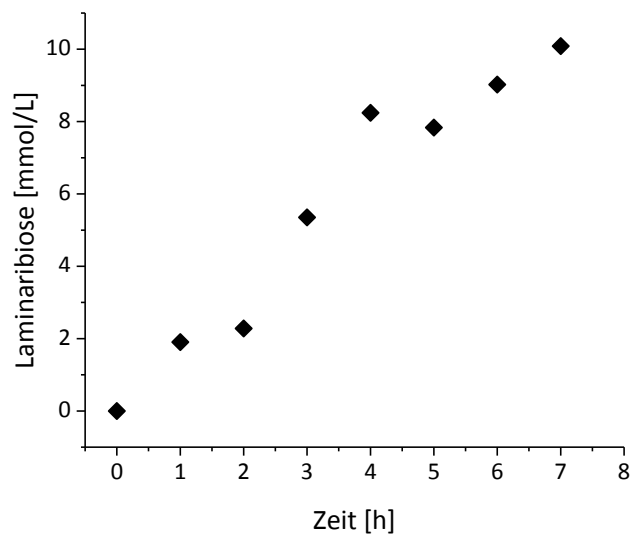
Eupergit C wurde als Trägermaterial ausgewählt, da es bereits häufig erfolgreich zur Immobilisierung von Enzymen verwendet wurde [z. B.: [74], [81], [77]]. Zusätzlich ist die Immobilisierung von Enzymen auch aus Zellrohextrakten möglich bzw. die Immobilisierung aus Rohextrakten führt sogar zu einer höheren operativen Stabilität [82]. Die Immobilisierungsmethode ist einfach und erfolgt ohne giftige Zusatzstoffe. Allerdings steht Eupergit C nicht mehr kommerziell zur Verfügung. Als alternative Träger wurden Sepabeads EC-EP/S ausgewählt. Dabei handelt es sich wie bei Eupergit C um ein epoxyaktiviertes Acrylharz, das aus kugelförmigen makroporösen Partikeln mit großer innerer Oberfläche besteht und aufgrund seiner Ungiftigkeit wie Eupergit C in der pharmazeutischen und Nahrungsmittelindustrie verwendet werden kann [225], [226]. Die Träger unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer internen Morphologie und Hydrophobie, die zu Unterschieden in ihren Eigenschaften führen [227]. Während die Partikelgrößen von Eupergit C und Sepabeads bei 100-300 µm liegen, sind die ECR-Immobilisate mit Partikelgrößen zwischen 300-710 µm deutlich größer.

Bei Immobilisierung mit Hilfe von Glutardialdehyd auf ECR8309 M geht mit 84 % der LP-Aktivität mehr Aktivität als auf allen anderen kovalenten Trägern verloren. Für die Immobilisierung von LP scheinen sich Epoxygruppen damit insgesamt besser zu eignen.

Von den Epoxyträgern kann auf Sepabeads EC-EP/S mit 65 % die meiste LP-Aktivität erhalten werden. Auf den anderen Trägern bleibt ca. 30 % der nativen Enzymaktivität erhalten. Höhere Immobilisierungseffizienzen auf Sepabeads EC-EP/S im Vergleich mit Eupergit C konnten bereits D'Arrigo et al. [228] erzielen. Mateo et al. [226] erreichten eine deutlich bessere Stabilisierung.

Mit 65 % kann ein großer Teil der Aktivität des nativen Enzyms trägerfixiert werden. Da die kovalente Bindung außerdem verhindert, dass sich beim Einsatz der Immobilisate freie Proteine im Reaktionsraum befinden, wurden Sepabeads EC-EP/S als Immobilisierungsträger ausgewählt. Bevor die Methode allerdings weiter optimiert wurde, wurde zunächst überprüft, ob eine Immobilisierung von SP auf Sepabeads ebenfalls möglich ist und es im trienzymatischen System mit granularer GI zur Bildung von Laminaribiose kommt.

Bei der Immobilisierung von SP auf Sepabeads verlor das Enzym 75 % seiner Aktivität.



**Abbildung 4** Laminaribiosebildung im trienzymatischen System aus 0,05 g SP-Sepabeads; 0,1 g Gl; 0,1 g LP-Sepabeads in 4 mL 0,18 mol/L Saccharose [in 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit (pH 6,2)]. Inkubation erfolgte bei 37 °C im Thermoschüttler bei 1000 UpM.

Abbildung 4 zeigt, dass die Laminaribiosekonzentration im trienzymatischen System über acht Stunden linear ansteigt. Die Bildung von bis zu 10 mmol/L (3,4 g/L) Laminaribiose zeigt, dass sich Sepabeads für die Immobilisierung der Enzyme und einen multienzymatischen Einsatz eignen.

## 5.2 Immobilisierung von Enzymen auf Sepabeads

Die Eignung von Sepabeads als Immobilisierungsträger wurde bereits im vorangegangenen Kapitel bewiesen. Das folgende Kapitel beschreibt die Optimierung der Immobilisierungsmethode, die Charakterisierung der Immobilisate sowie ihren Einsatz in der multienzymatischen Produktion von Laminaribiose.

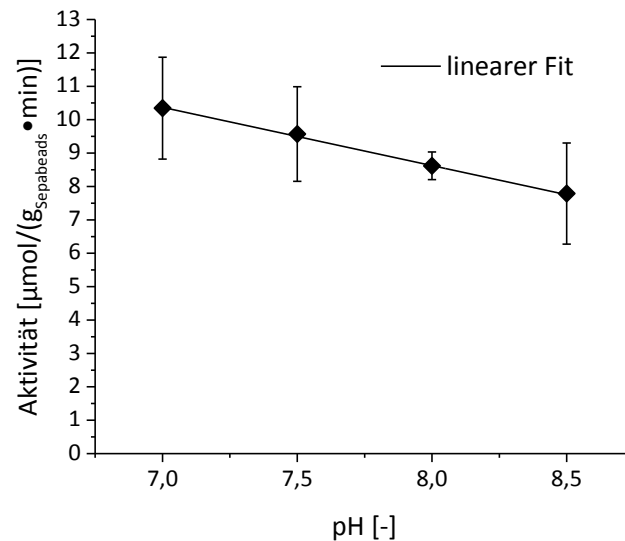
### 5.2.1 Optimierung der Immobilisierung auf Sepabeads

Zu den Faktoren, die Einfluss auf die Immobilisierung von Enzymen haben können, gehört die Proteinkonzentration, die Temperatur, der pH-Wert und die Molarität des Puffers sowie die Immobilisierungsdauer. Da die Immobilisierung in hoch molaren Puffern stattfindet, wurde die Immobilisierung bei Raumtemperatur durchgeführt, um das Ausfallen von Pufferkomponenten bei niedrigeren Temperaturen zu verhindern.

Für SP wurde mithilfe eines statistischen Versuchsplans der pH-Wert, die Immobilisierungsdauer und die Proteinkonzentration auf ihren Einfluss auf die Immobilisierung untersucht (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigten, dass der einzige signifikante Einflussfaktor die Proteinkonzentration ist. Die Proteinkonzentration kann damit zur Einstellung der Aktivität der SP-Sepabeads genutzt werden und auf diese Weise die Aktivität der SP-Immobilisate der Aktivität der LP-Immobilisate angepasst werden.

Für LP wurde zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts und der Proteinkonzentration ein klassischer Versuchsaufbau gewählt, bei der alle Variablen außer einer konstant gehalten werden. Die Inkubationszeit wurde auf 24 h fixiert, da eine starke Bindung des Enzyms an den Träger an mehreren Stellen angestrebt wurde, die mit längeren Reaktionszeiten erreicht wird. •

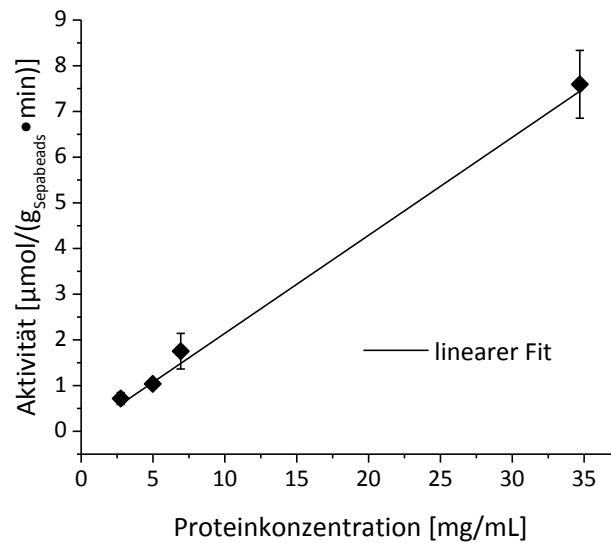
Wie bereits in der Theorie besprochen, kommt es bei hoher Ionenstärke des Puffers zur Adsorption der Proteine [72], bevor die Epoxidgruppen bei pH-Werten um 7 schnell mit Amingruppen reagieren [73]. Aus diesem Grund wurde die Immobilisierung von LP mit 1-molaren Puffern mit pH-Werten von 7 bis 8,5 untersucht.



**Abbildung 5 Optimierung des pH-Wertes während der Immobilisierung von Laminaribiosephosphorylase (N = 3).** Die Aktivität wurde mit 0,05 g Sepabeads in 2 mL Substrat (0,1 mol/L Glu und 0,05 mol/L G1P) bestimmt. [ $y = -1,74 x + 22,58$  ( $r = 0,999$ )]. Abbildung nach [229]).

Abbildung 5 zeigt, dass die Aktivität von Laminaribiosephosphorylase mit zunehmendem pH-Wert des Puffers linear abnimmt. Die Fehlerbalken bestätigen das Ergebnis der Untersuchung auf Einflussfaktoren bei Immobilisierung von Sucrosephosphorylase, dass der pH-Wert ein statistisch nicht relevanter Einflussfaktor bei der Immobilisierung auf Sepabeads ist. Da bei einem neutralen pH-Wert die Aktivität von LP-Sepabeads am höchsten war, wurde für alle nachfolgenden Versuche und auch für Immobilisierung von Sucrosephosphorylase ein 1-molarer Puffer mit einem pH-Wert von 7 verwendet.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Immobilisierung untersucht. Dazu wurde der Rohextrakt mit LP-Aktivität unterschiedlich stark verdünnt auf Sepabeads immobilisiert.



**Abbildung 6 Optimierung der Proteinkonzentration während der Immobilisierung (N = 2).** Die Aktivität wurde mit 0,05 g Sepabeads in 2 mL Substrat (0,05 mol/L Glu und 0,075 mol/L G1P) bestimmt. [ $y = 0,21 \cdot x$  ( $r = 0,998$ )]. Abbildung nach [229].

Abbildung 6 zeigt den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Immobilisierung. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Aktivität der LP-Sepabeads linear zu. Die Immobilisierung des Rohextrakts mit einer Proteinkonzentration von 35 mg/mL ergibt die aktivsten LP-Sepabeadimmobilisate. Torres und Batista-Viera [227] untersuchten die Immobilisierung von  $\beta$ -Galactosidase aus Sepabeads EC-EP. Die aktivsten Immobilisate erhielten sie ebenfalls mit Proteinkonzentrationen um 30 mg/mL. Sie konnten 100 % Enzymaktivität erhalten und eine vollständige Immobilisierung des Enzyms erreichen. Im Gegensatz dazu bleibt bei Immobilisierung des *E. gracilis* Rohextrakts Protein und Aktivität im Überstand nach Immobilisierung erhalten. Da während der Immobilisierung Protein ausfällt, kann der Anteil des immobilisierten Proteins allerdings nicht quantifiziert werden. Der lineare Zusammenhang deutet jedoch daraufhin, dass eine Erhöhung des LP-Anteils im Rohextrakt zu aktiveren Immobilisaten führt. Da bei Annahme einer durchschnittlichen molekularen Masse von 60 kDa im *E. gracilis* Rohextrakt etwa 0,6  $\mu\text{mol}$  Protein mit 10  $\mu\text{mol}$  Epoxygruppen auf den Sepabeads reagieren, kann davon ausgegangen werden, dass das Immobilisat noch nicht gesättigt ist.

Bei der Optimierung der Immobilisierung von LP auf Sepabeads wurde ebenfalls festgestellt, dass der relevanteste Einflussfaktor die Proteinkonzentration ist. Da hochmolare Puffer zur Immobilisierung über Epoxygruppen bevorzugt werden und ein pH-Wert von 7 bei LP die besten Ergebnisse erzielte, wurde für alle weiteren Versuche bei der Aufreinigung LP in 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) gelöst und dialysiert. Zur Immobilisierung wurde der Rohextrakt unverdünnt verwendet. Damit haben sich die in den Vorversuchen bereits genutzten Bedingungen als optimal herausgestellt.

Für die Immobilisierung von SP wurde das Enzym mindestens 1:2 mit dem Puffer vor Immobilisierung verdünnt und ansonsten die Proteinkonzentration zum Einstellen der Aktivität der Sepabeadimmobilisate genutzt. Bei einer 1:2 Verdünnung bleibt 25 % der nativen Enzymaktivität erhalten.



## 5.2.2 Charakterisierung der Enzyme (auf Sepabeads) und GI- Granulat – Festlegung von Reaktionsbedingungen

Die nativen Enzyme des trienzymatischen Systems weichen im Hinblick auf ihre Optimalbedingungen stark voneinander ab. Da die Enzyme in einem multienzymatischen System gemeinsam eingesetzt werden sollten, war das Hauptziel der Charakterisierung der immobilisierten Enzyme nicht das Auffinden optimaler Bedingungen für jedes einzelne Enzym, sondern die Charakterisierung des enzymatischen Verhaltens und der Stabilität unter möglichen Prozessbedingungen. Um auch die Beziehungen der einzelnen Faktoren/Bedingungen untereinander bestimmen zu können, wurden die Enzyme mit Hilfe statistischer Versuchsplanung charakterisiert. Als relevante Faktoren im Hinblick auf eine spätere Prozessentwicklung wurden die Temperatur, sowie der pH-Wert und die Molarität des Natriumphosphatpuffers definiert und untersucht. Die zu testenden Bereiche wurden festgelegt, basierend auf Informationen über die nativen Enzyme, eigenen Voruntersuchungen und Literaturdaten. Der Temperaturbereich für SP und GI ist aufgrund der höheren Optimaltemperaturen der nativen Enzyme weiter als der für LP.

Zur Untersuchung wurde ein *Central Composite Design (face-centered)* genutzt, aus dem sich *Response Surfaces* ableiten lassen. Die Auswertung erfolgte mit DesignExpert® 10.0.1 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Tabelle 13 fasst die Bereiche und Kodierungen der untersuchten Faktoren zusammen.

### 5.2.2.1 Sucrocephosphorylase

Es wurde bereits von Cerdobbel et al. [201] festgestellt, dass Sepabeads EC-EP/S für Sucrocephosphorylase kein ideales Trägermaterial darstellen. Eine Immobilisierung von SP und LP auf unterschiedlichen Trägermaterialien würde allerdings den Immobilisierungsaufwand erhöhen und durch unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten der Substrate, Produkte und Intermediate in den unterschiedlichen Trägermaterialien, die Beschreibung des Reaktionssystems verkomplizieren. Unterstützt wird diese Annahme durch Ergebnisse von Rodríguez-Alonso et al. [146], die beweisen konnten, dass es für enzymatische Kaskadenreaktoren entscheidend ist, dass die Trägermaterialien homogene Eigenschaften aufweisen. Da bereits durch die Verwendung von granularer GI mit Einschränkungen zu rechnen ist, sollte SP auf dem gleichen Träger wie LP immobilisiert werden.

Der Versuchsplan und die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die Fructosekonzentration nach 10 min wurde als Antwortvariable für die Phosphorolyse bzw. Umwandlung von Saccharose verwendet und die Glucosekonzentration als Antwortvariable für die Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes bzw. der Hydrolyse von Saccharose und Glucose-1-phosphat.

**Tabelle 27 Versuchsbedingungen und Ergebnisse des (*face centered*) Central-Composite Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von pH-Wert und Molarität des Puffers und der Temperatur auf die Bildung von Fructose und Glucose durch SP-Sepabeads. Fructose und Glucoseproduktion von 0,05 g SP-Sepabeads wurde in 2 mL Batch-Experimenten mit 0,2 mol/L Saccharose unter den aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die gemessenen Fructose und Glucosekonzentrationen nach 10 min wurden als Antwortvariablen festgelegt. Nach [229].**

Run	A pH [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]	Systemantwort [mmol/L]	
				Y <sub>1</sub> Fructose 10 min	Y <sub>2</sub> Glucose 10 min
1	7,5	0,1	37	1,15	0,17
2	6	0,1	37	1,49	0,33
3	7,5	0,01	37	1,00	0,32

Run	A pH [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]	Systemantwort [mmol/L]	
				Y <sub>1</sub> Fructose 10 min	Y <sub>2</sub> Glucose 10 min
4	6,75	0,055	37	2,02	0,31
5	6	0,01	37	1,65	0,49
6	6,75	0,1	43,5	2,72	0,38
7	6,75	0,055	43,5	3,13	0,47
8	6,75	0,055	43,5	2,97	0,44
9	6,75	0,055	43,5	2,94	0,43
10	6	0,055	43,5	2,71	0,53
11	6,75	0,01	43,5	2,15	0,56
12	7,5	0,055	43,5	1,79	0,27
13	6,75	0,055	50	3,89	0,58
14	6	0,01	50	2,52	0,73
15	7,5	0,1	50	1,32	0,21
16	6	0,1	50	3,43	0,59
17	7,5	0,01	50	1,49	0,51

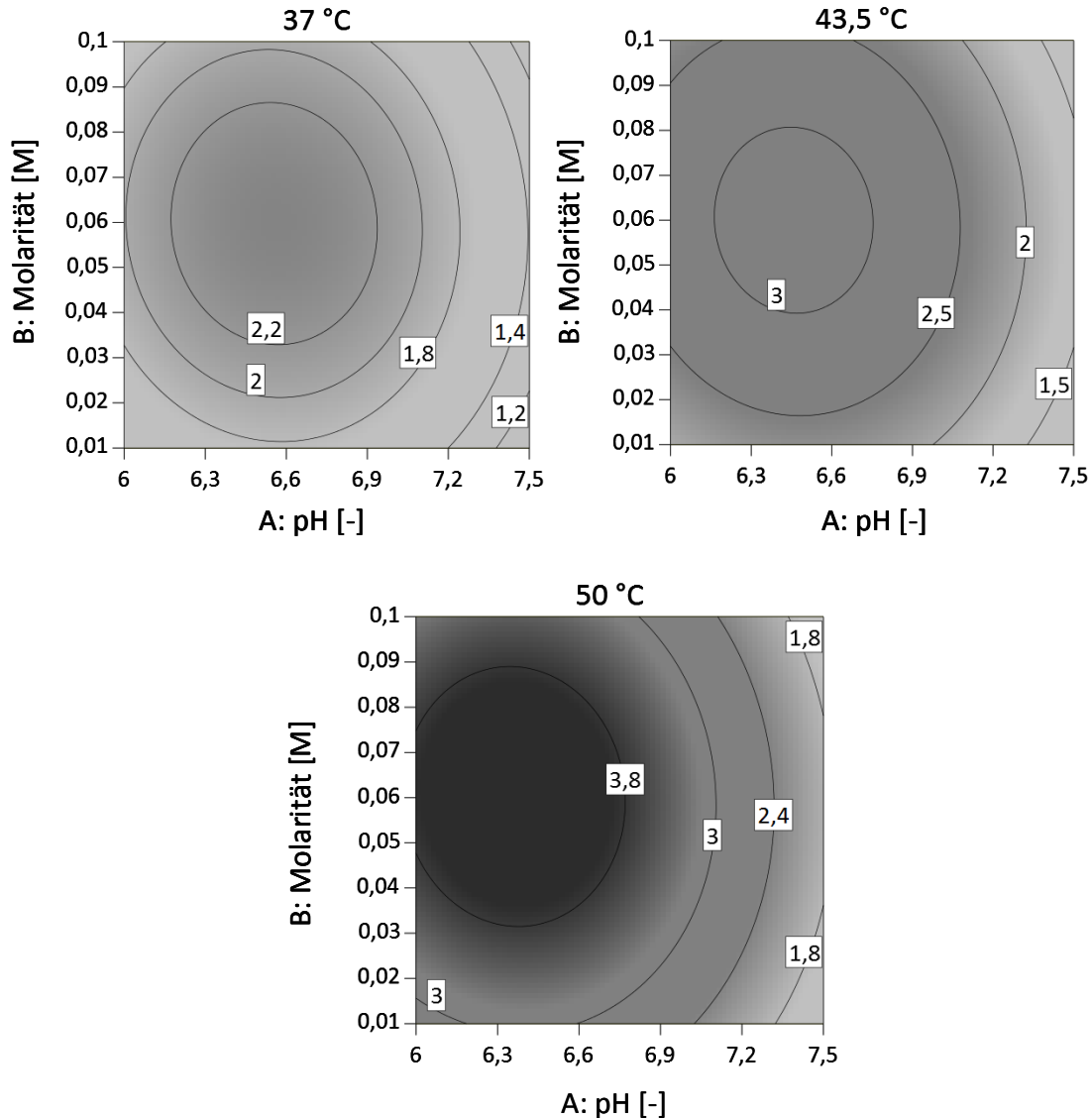
Die Daten wurden mithilfe von Design-Expert® an ein Modell zweiter Ordnung gefittet. Zur Bewertung der Modelle wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Das Modell wurde um insignifikante Modellterme reduziert, wenn es dadurch verbessert wurde. Die Modellgleichungen für die Antwortvariablen Y<sub>1</sub> und Y<sub>2</sub> lauten:

$$Y_1 = 1,09 - 0,27 A + 0,047 B + 0,25 C - 0,023 AB - 0,089 AC - 0,35 A^2 - 0,25 B^2 \quad (12)$$

$$Y_2 = 0,45 - 0,12 A - 0,093 B + 0,099 C - 0,019 AB - 0,036 AC - 0,048 A^2 + 0,023 B^2 \quad (13)$$

Die Gesamtübersicht der Varianzanalysen befindet sich im Anhang (Kapitel 9.1). Für beide Modelle zeigt der F-Wert, dass sie signifikant sind, mit einer nur 0,01 %igen Chance, dass F-Werte dieser Größe durch Rauschen (noise) zustande kommen. In beiden Modellen sind der pH-Wert (A) und die Temperatur (C) signifikante Modellterme. Die Molarität (B) ist nur bei der Hydrolyse signifikant. Da die Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes hauptsächlich bei geringer Molarität des Puffers stattfindet [199], ist dies nicht überraschend. Wie erwartet kommt es mit abnehmenden Phosphatkonzentrationen verstärkt zur Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes. Die Bestimmtheitsmaße von Y<sub>1</sub> und Y<sub>2</sub> sind 0,957 bzw. 0,974. Es kann also 95,7 bzw. 97,4 % der Gesamtabweichung durch das Modell erklärt werden.

Die Visualisierung der Modellgleichungen erfolgt über Response Surface Plots (3D) oder Konturplots (2D). Eine Response Surface Plot ist ein theoretischer dreidimensionaler Plot, der die Beziehung der Systemantworten zu den unabhängigen Variablen zeigt. In Konturplots werden Linien mit konstanter Systemantwort eingezeichnet. Zeigt ein Konturplot Ellipsen oder Kreise, deutet das Zentrum auf eine maximale oder minimale Systemantwort hin [158]. Abbildung 7 zeigt den Einfluss der Molarität und des Puffers auf die Fructosebildung bei 37, 43,5 und 50 °C. Die Konturplots sind so zu verstehen, dass dunkle Bereiche für Bedingungen stehen, bei denen es zu hoher Produktbildung kommt. Die Produktivität in Bezug auf Fructose ist bei hohen Temperaturen am größten. Bei 43,5 °C gibt es ein schmales Fenster zwischen pH 6,2 und 6,7 sowie Molaritäten zwischen 0,05 und 0,07 M mit erhöhter Fructosebildung.



**Abbildung 7** Konturplots der Antwortvariable  $Y_1$  – Fructosekonzentration nach 10 min. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei 37 °C, 43,5 °C und 50 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Fructoseproduktion wurde mit 0,05 g Immobilisaten in 2 mL 0,2 mol/L Saccharose bestimmt. Nach [229].

Die Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes führt zur Bildung von Glucose. Abbildung 8 zeigt, dass die Hydrolyse bei niedrigen pH-Werten und Molaritäten besonders stark ist. Eine verstärkte Hydrolyse bei niedrigeren pH-Werten passt gut zu Ergebnissen von Silverstein et al. [186], die ein pH-Optimum von 6,3 für die Hydrolyse bestimmten und ein pH-Optimum von 7 für die Phosphorolyse. Weimberg und Doudoroff [230] geben an, dass der Anteil der Hydrolyse von Saccharose und Glucose-1-phosphat bei freier Sucrosephosphorylase bei 1 bis 2 % der Phosphorolyse liegt. Bei den SP-Sepabeads ist die Hydrolyse deutlich stärker ausgeprägt. Das kann zum einen auf eine verstärkte Hydrolyseaktivität des verwendeten nativen Enzyms zurückzuführen sein oder auf eine Verstärkung der Hydrolyseaktivität als Folge der Immobilisierung, wobei die Ergebnisse von Zein [231] darauf hindeuten, dass das native Enzym bereits eine erhöhte Hydrolyseaktivität besitzt, die durch die Immobilisierung weiter verstärkt wird.

Da Glucose-1-phosphat für die Bildung von Laminaribiose essentiell ist, sollten die Bedingungen für SP so gewählt werden, dass die Hydrolysereaktion möglichst gering ist. Als Konsequenz wurde bei der

Bestimmung von Optimalbedingungen für SP eine Reduzierung der Glucoseproduktion stärker gewichtet als die Fructoseproduktion (Tabelle 28).

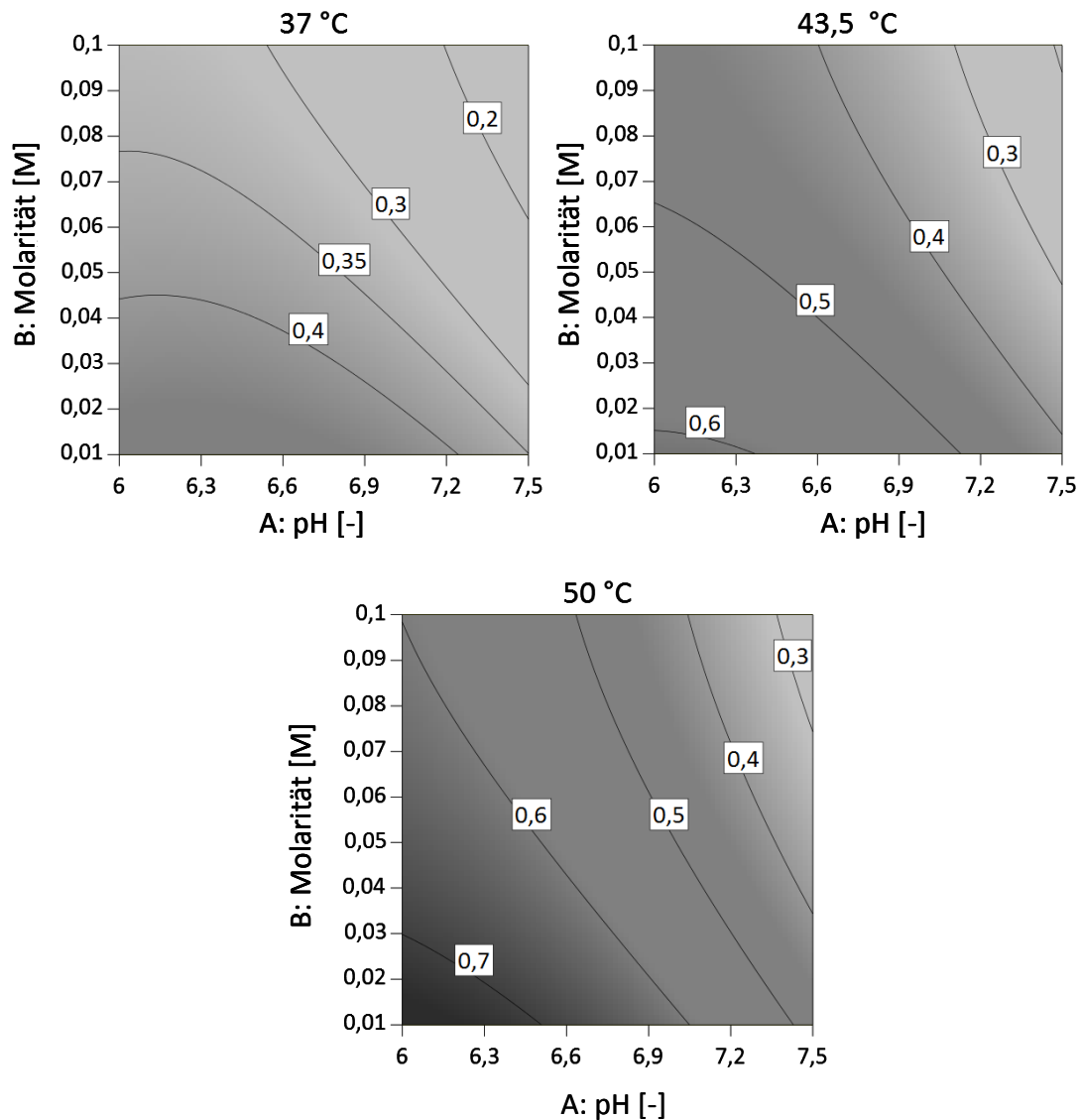


Abbildung 8 Konturplots der Antwortvariable Y<sub>2</sub> – Glucosekonzentration nach 10 min. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei 37 °C, 43,5 °C und 50 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Glucoseproduktion wurde mit 0,05 g Immobilisaten in 2 mL 0,2 mol/L Saccharose bestimmt. Nach [229].

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der Optimierung der Bedingungen für SP-Sepabeads. Da die Hydrolyse bei niedrigen Molaritäten und pH-Werten sowie hohen Temperaturen verstärkt stattfindet und die Minimierung der Hydrolyserate stärker gewichtet wurde als die Maximierung der Fructosebildung, liegt das Optimum mit einer Temperatur von 37 °C, einer Molarität von 0,08 M und einem pH-Wert von 6,8 im Bereich niedriger Temperaturen, höherer pH-Werte und Molaritäten.

Tabelle 28 Gewichtung der Systemantworten des Versuchsplans zur Untersuchung der Effekte des pH-Wertes, der Molarität und der Temperatur auf SP-Sepabeads und die Ergebnisse der Optimierung.

Systemantwort	Ziel	Gewichtung	Optimum
Fructose nach 10 min	Maximierung	+	pH 6,82 Molarität 0,08 M Temperatur 37 °C
Glucose nach 10 min	Minimierung	++	

### 5.2.2.2 Laminaribiosephosphorylase

Nachdem der Einfluss von pH und Proteinkonzentration auf die Immobilisierung von LP charakterisiert war, wurden die LP-Immobilisate hinsichtlich ihrer Temperatur, pH-Wert und Molaritätspräferenzen während der Katalyse untersucht. Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe eines statistischen Versuchsplans (*central-composite design; face-centered*). Der Versuchsplan und die Ergebnisse sind in Tabelle 29 aufgeführt.

**Tabelle 29** Versuchsbedingungen und Ergebnisse des (*face centered*) *Central-Composite*-Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von pH-Wert und Molarität des Puffers sowie der Temperatur auf die Bildung von Laminaribiose durch LP-Sepabeads, bei erster und zweiter Verwendung. Die Laminaribioseproduktion von 0,05 g LP-Sepabeads wurde in zwei aufeinanderfolgenden 2 mL Batch-Experimenten mit 0,05 mol/L Glucose und 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat unter den aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die gemessenen Laminaribiosekonzentrationen nach 30 min (Y<sub>1</sub>) in der ersten Verwendung und nach 60 min (Y<sub>2</sub>) in der zweiten Verwendung wurden als Antwortvariablen festgelegt. Nach [229].

Run	A pH [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]	Systemantwort [mmol/L]	
				Y <sub>1</sub> Lam 30 min (1. Verwendung)	Y <sub>2</sub> Lam 60 min (2. Verwendung)
1	7,5	0,1	37	4,65	7,53
2	6	0,1	37	7,27	10,81
3	7,5	0,01	37	4,48	7,47
4	6,75	0,055	37	8,14	16,26
5	6	0,01	37	8,53	14,13
6	6,75	0,1	41	7,27	14,04
7	6,75	0,055	41	8,03	13,07
8	6,75	0,055	41	8,06	12,84
9	6,75	0,055	41	7,80	12,72
10	6	0,055	41	8,38	13,46
11	6,75	0,01	41	7,30	9,79
12	7,5	0,055	41	5,57	8,43
13	6,75	0,055	45	8,78	10,61
14	6	0,01	45	8,94	8,86
15	7,5	0,1	45	5,33	5,74
16	6	0,1	45	8,22	12,67
17	7,5	0,01	45	4,67	2,08

Es folgte ein Fit der Daten an ein Modell zweiter Ordnung analog zur Charakterisierung von SP-Sepabeads und eine Bewertung der Modelle mittels Varianzanalyse. Dabei ergaben sich die folgenden Modellgleichungen:

$$Y_1 = 8,03 - 1,66 A - 0,12 B + 0,29 C + 0,53 AB - 0,06 AC + 0,13 BC - 1,10 A^2 - 0,79 B^2 + 0,39 C^2 \quad (14)$$

$$Y_2 = 3,66 - 0,50 A + 0,17 B - 0,29 C + 0,11 AB - 0,14 AC + 0,25 BC - 0,43 A^2 - 0,28 B^2 + 0,07 C^2 \quad (15)$$

Eine ausführliche Übersicht der Ergebnisse der Varianzanalyse befindet sich im Anhang (Kapitel 9.1). Die Signifikanz beider Modelle wird durch die F-Werte bestätigt. Es gibt nur eine 0,01 %ige Chance, dass F-Werte dieser Größenordnung aufgrund von Hintergrundrauschen (noise) entstehen könnten. Signifikante Modellterme sind im Fall von Modell Y<sub>1</sub> A, C, AB, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup> und C<sup>2</sup>. Die Signifikanz ergibt sich aus Prob>F-Werten, die kleiner als 0,05 sind. Im Fall von Modell Y<sub>2</sub> sind A, B, C, AC, BC, A<sup>2</sup> und B<sup>2</sup> signifikante Modellterme. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der wichtigste Faktor bezogen auf

die Aktivität der LP-Sepabeads der pH-Wert (A) ist, gefolgt von der Temperatur (C). Der Einfluss der Molarität ist dagegen schwächer ausgeprägt und wirkt sich erst bei längerer Verwendung aus. 99,3 bzw. 97,7 % der Gesamtabweichung lassen sich durch das Modell erklären wie die Bestimmtheitsmaße von  $Y_1$  0,993 und  $Y_2$  0,977 zeigen. Abbildung 9 zeigt, dass es bei kurzen Reaktionszeiten (30 min) bei der höchsten Temperatur (45 °C) zur höchsten Laminaribioseproduktion kommt. Beim Vergleich der Konturplots mit denen in Abbildung 10 wird deutlich, dass sich bei längeren Inkubationszeiten die Bedingungen für hohe Laminaribioseproduktion zu niedrigeren Temperaturen verschieben. Diese Verschiebung lässt sich durch eine geringe Stabilität des Enzyms bei hohen Temperaturen erklären.

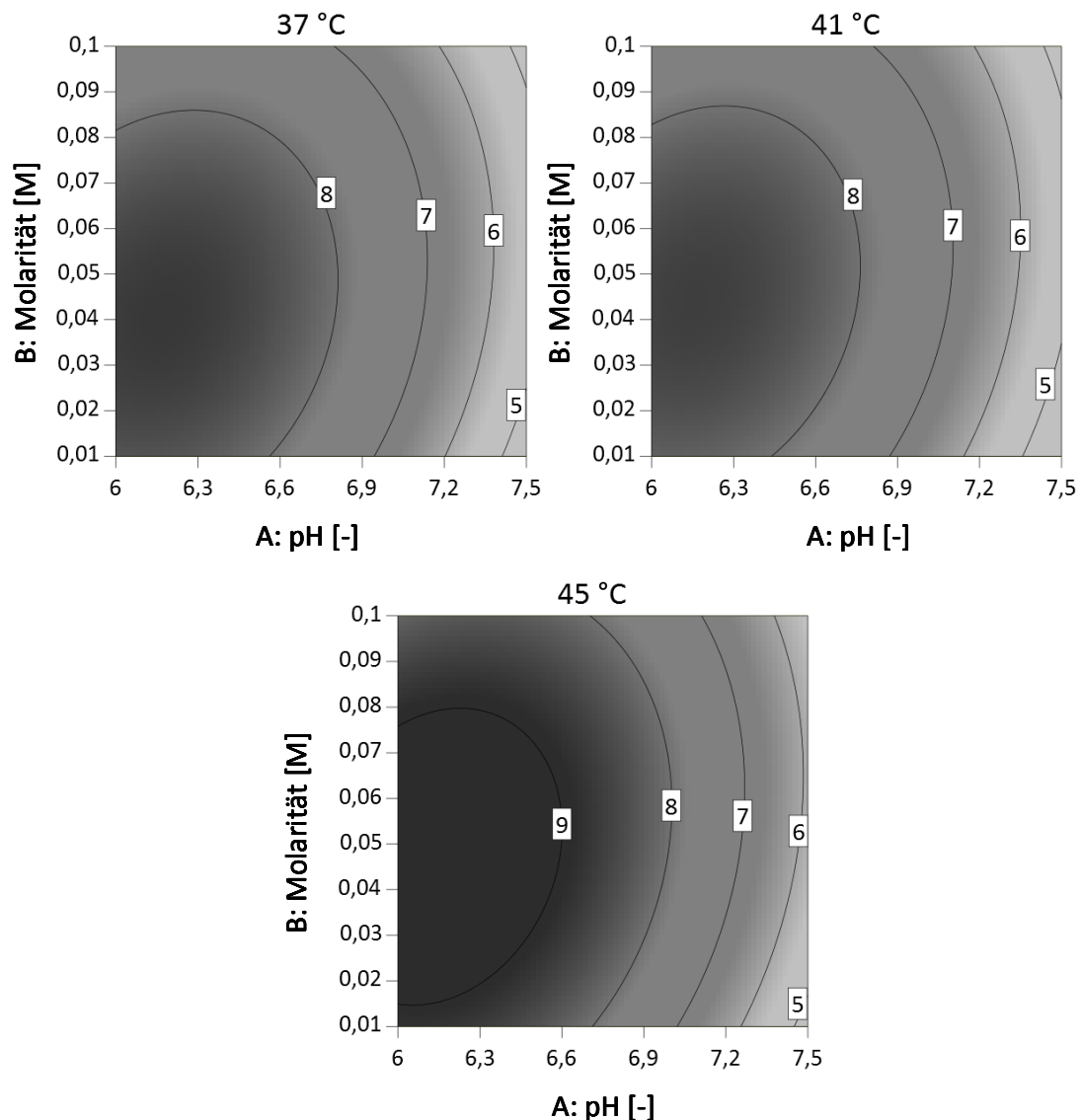
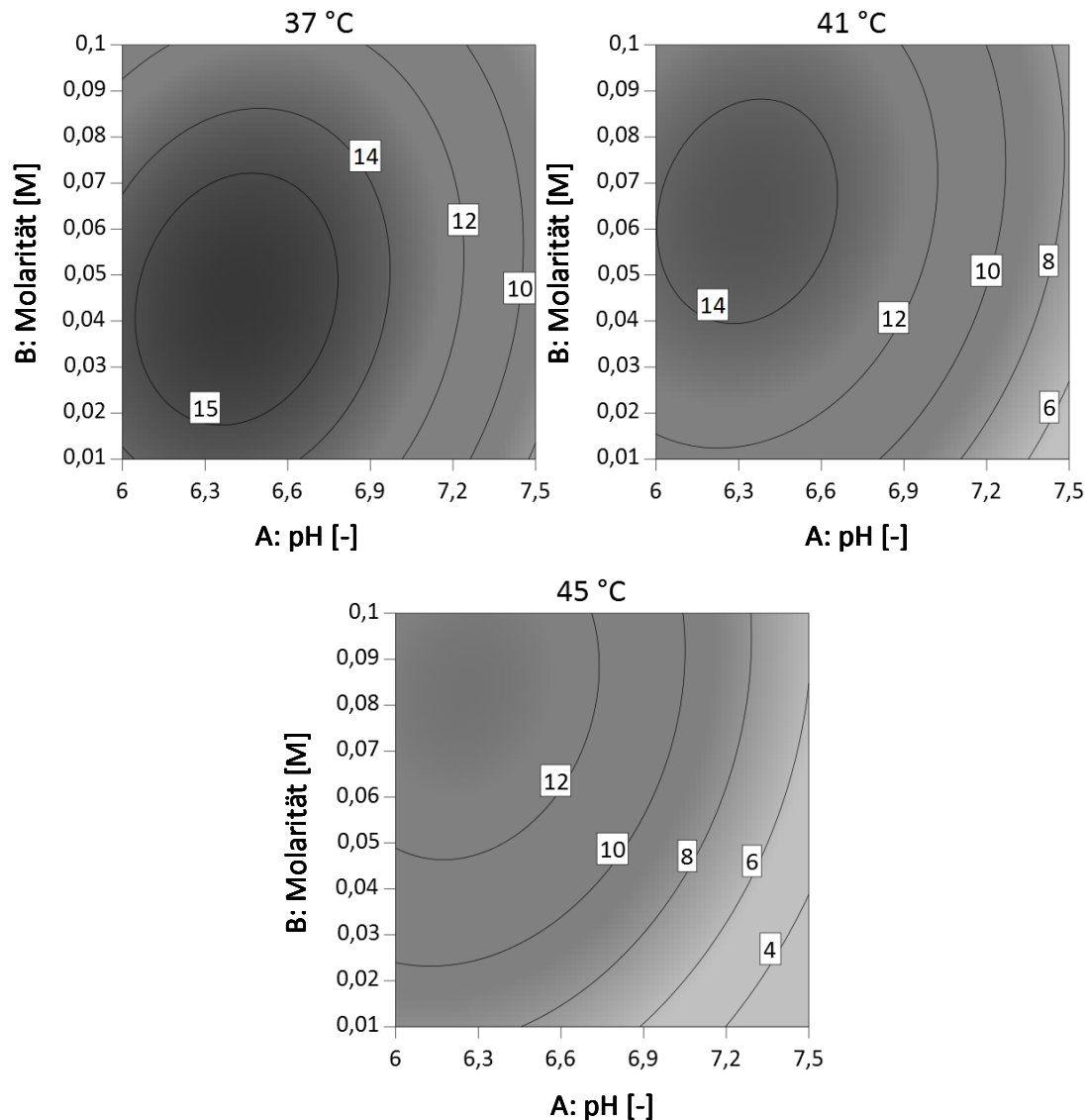


Abbildung 9 Konturplots der Antwortvariable  $Y_1$  – Laminaribiosekonzentration nach 30 min. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei 37 °C, 41 °C und 45 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Laminaribioseproduktion wurde mit 0,05 g Immobilisaten in 2 mL 0,05 mol/L Glucose und 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat bestimmt. Nach [229].



**Abbildung 10** Konturplots der Antwortvariable  $Y_2$  – Laminaribiosekonzentration nach 60 min der zweiten Verwendung. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei 37 °C, 41 °C und 45 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Laminaribioseproduktion wurde mit 0,05 g Immobilisaten in 2 mL 0,05 mol/L Glucose und 0,05 mol/L Glucose-1-phosphat bestimmt. Nach [229].

Insgesamt kann festgehalten werden, dass bei 37 °C, eine Pufferkonzentration unterhalb 0,06 M und pH-Werte geringer als 6,7 zu hohen Laminaribiosekonzentrationen führen. Beim Vergleich der Konturplots bei 45 °C wird außerdem bei hohen Temperaturen ein leicht stabilisierender Effekt hoher Molaritäten auf das Enzym erkennbar. Während es in der ersten Verwendung noch bei Molaritäten zwischen 0,02 und 0,08 M zu hoher Laminaribiosebildung kam, verschiebt sich das Optimum in der zweiten Verwendung zu mittleren (0,04 M) bis hohen (0,1 M) Molaritäten.

### 5.2.2.3 Glucoseisomerase

Die Charakterisierung des Glucoseisomerasegranulats erfolgte analog zur Charakterisierung von Sucrosephosphorylase. Es wurde nur die Isomerisierung von Fructose und Glucose untersucht, da sie in dieser Richtung im trienzymatischen System erfolgen sollte. Aus diesem Grund wurden die nach 10 und 60 min gebildeten Glucosekonzentrationen als Systemantworten gewählt. Da Glucoseisomerase sonst im HFCS-Prozess eingesetzt wird, für den von Bhosale et al. [212] Betriebstemperaturen zwischen

55 und 60 °C angegeben werden, liegt das Temperaturoptimum der verwendeten Glucoseisomerase wahrscheinlich bei Temperaturen über 50 °C. Der zu untersuchende Bereich wurde dennoch eingegrenzt, da eine längere stabile Aktivität der Enzyme aus mesophilen Organismen (SP und LP) bei diesen hohen Temperaturen nicht zu erwarten war. Die gewählten Versuchsbedingungen und Ergebnisse wurden in Tabelle 30 zusammengefasst.

**Tabelle 30** Übersicht über die Versuchsbedingungen und Ergebnisse des (*face centered*) *Central-Composite* Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von pH-Wert und Molarität des Puffers und der Temperatur auf die Bildung von Glucose durch GI-Granulat. Die Glucoseproduktion von 0,04 g GI-Granulat wurde in 2 mL Batch-Experimenten mit 0,2 mol/L Fructose unter den aufgeführten Bedingungen untersucht. Die nach 10 min bzw. 60 min gemessenen Glucosekonzentrationen wurden als Antwortvariablen (Y<sub>1</sub>) bzw. (Y<sub>2</sub>) definiert.

Run	A pH [-]	B Molarität [M]	C Temperatur [°C]	Systemantworten [mmol/L]	
				Y <sub>1</sub> Glu 10 min	Y <sub>2</sub> Glu 60 min
1	7,5	0,1	37	13,09	33,18
2	6	0,1	37	8,03	14,63
3	7,5	0,01	37	12,72	37,20
4	6,75	0,055	37	10,18	25,04
5	6	0,01	37	9,69	29,22
6	6,75	0,1	43,5	11,82	30,98
7	6,75	0,055	43,5	11,86	35,63
8	6,75	0,055	43,5	11,83	35,77
9	6,75	0,055	43,5	11,77	35,96
10	6	0,055	43,5	9,87	25,63
11	6,75	0,01	43,5	12,83	46,09
12	7,5	0,055	43,5	14,77	50,87
13	6,75	0,055	50	15,38	51,82
14	6	0,01	50	15,79	58,12
15	7,5	0,1	50	19,83	64,26
16	6	0,1	50	11,11	30,52
17	7,5	0,01	50	19,79	70,66

Der Fit der Daten an ein Modell zweiter Ordnung ergab folgende Modellgleichungen:

$$Y_1 = 0,08 - 0,02 A + 5,24E-3 B - 0,02 C - 6,30E-3 AB + 2,55E-3 AC + 9,19E-4 BC + 4,90E-4 A^2 - 2,77E-3 B^2 - 2,42E-3 C^2 \quad (16)$$

$$Y_2 = 36,11 + 9,80 A - 6,77 B + 13,61 C + 3,97 AB + 2,47 AC - 1,92 BC + 1,90 A^2 + 2,19 B^2 + 2,08 C^2 \quad (17)$$

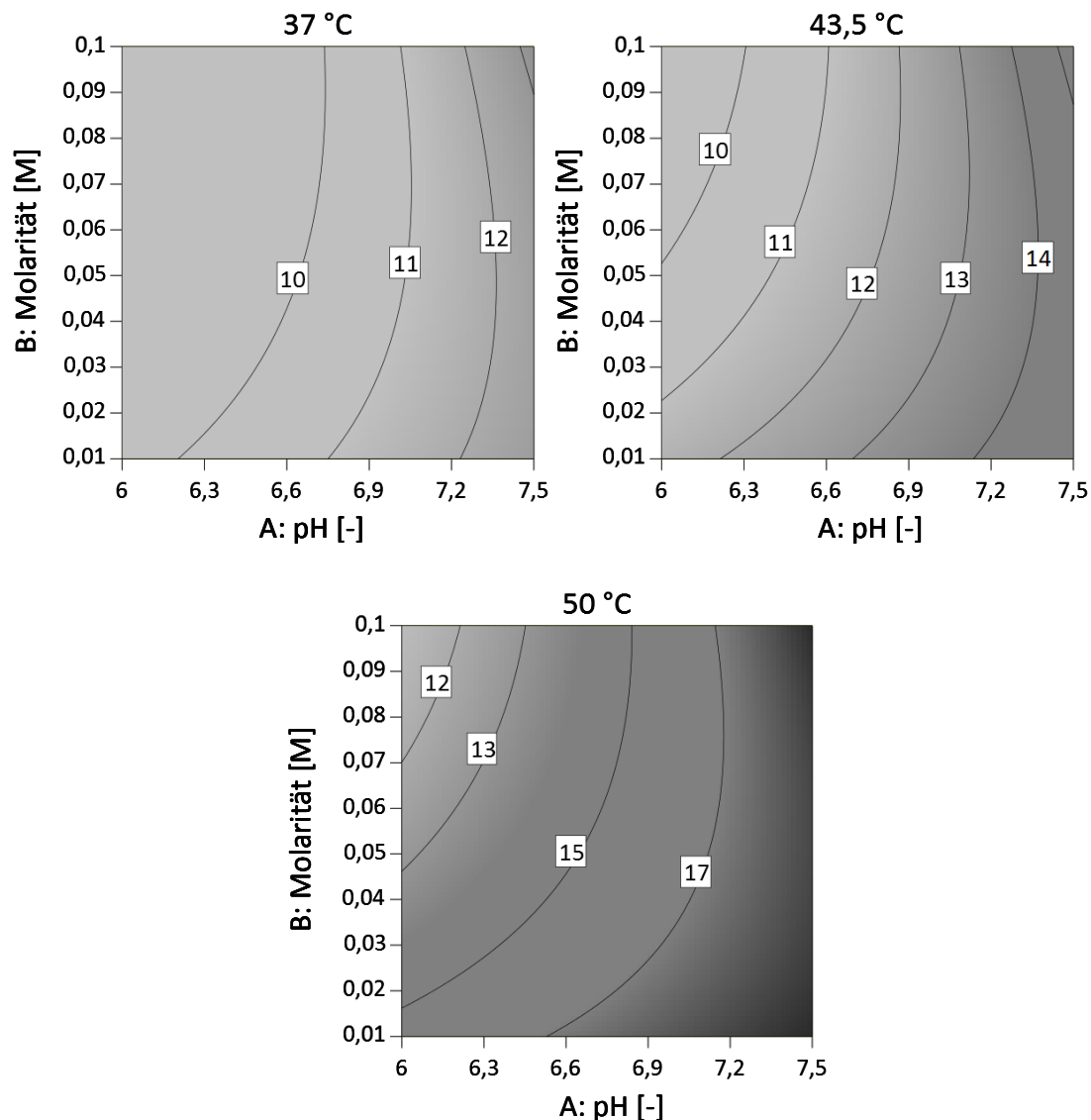
Die erhaltenen Modelle wurden mittels Varianzanalyse bewertet. Die vollständige Varianzanalyse befindet sich im Anhang (9.1). Für beide Modelle bestätigen die F-Werte die Signifikanz der Modelle. Die Wahrscheinlichkeit, dass F-Werte dieser Größenordnung durch Hintergrundrauschen zustande kommen, liegt bei 0,01 %. Die Signifikanz ergibt sich aus Prob>F-Werten, die kleiner als 0,05 sind.

Die Bestimmtheitsmaße von Y<sub>1</sub> 0,998 und Y<sub>2</sub> 0,990 zeigen, dass 99,8 % bzw. 99,0 % der Gesamtabweichung mit den Modellen erklärt werden kann.

In Modell Y<sub>1</sub> nehmen die Modellterme A, B, C, AB, AC, B<sup>2</sup> und C<sup>2</sup> Werte kleiner als 0,05 an und sind somit signifikant. In Modell Y<sub>2</sub> sind die Modellterme A, B, C, AB, AC und BC signifikant. Die Ergebnisse



zeigen, dass die Temperatur (C) den größten Einfluss auf die Aktivität des GI- Granulats hat, gefolgt von dem Einfluss des pH-Wertes (A) und der Molarität (B). Abbildung 11 und Abbildung 12 verdeutlichen den Einfluss der Faktoren. Die dunklen Bereiche zeigen, dass es nach 10 und 60 min nur bei hohen Temperaturen (50 °C) zu hoher Glucosebildung kommt. Zusätzlich lässt sich eine Tendenz zu höherer Glucosebildung bei höheren pH-Werten erkennen. Im Gegensatz dazu wird der geringe Einfluss der Molarität in den Abbildungen nochmals verdeutlicht. Eine leichte Erhöhung der Glucoseproduktion bei niedrigen Molaritäten kann an der etwas breiteren Dunkelfärbung des Konturplot bei 50 °C bei niedrigen Molaritäten abgelesen werden.



**Abbildung 11** Konturplots der Antwortvariable  $Y_1$  – Glucosekonzentration nach 10 min. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei 37 °C, 43,5 °C und 50 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Glucoseproduktion wurde mit 0,04 g Immobilisaten in 2 mL 0,2 mol/L Fructose bestimmt.

Zusätzliche Experimente mit GI-Granulat in Puffer haben gezeigt, dass das Granulat selbst bereits Glucose und Fructose enthält, welche bei der Suspension in Puffer aus dem Granulat diffundieren (Abbildung 13). Nach etwa 15 min ist dieser Prozess abgeschlossen. In den ersten Minuten diffundiert also gleichzeitig mit der Glucose, die bereits im Granulat enthalten ist, Glucose aus dem Granulat, die durch Isomerisierung aus Fructose gebildet wird. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die

Systemantwort  $Y_1$  dadurch stark beeinflusst bzw. überlagert wird. Die eigentliche Enzymreaktion ist erst nach 60 min beobachtbar. Allerdings wird die Diffusion aus dem Granulat auch von den bereits im Medium vorliegenden Zuckern beeinflusst. Dies erklärt, wieso nach 60 min während der Charakterisierung Glucosekonzentrationen gemessen werden, die unterhalb der im Granulat enthaltenen Mengen liegen.

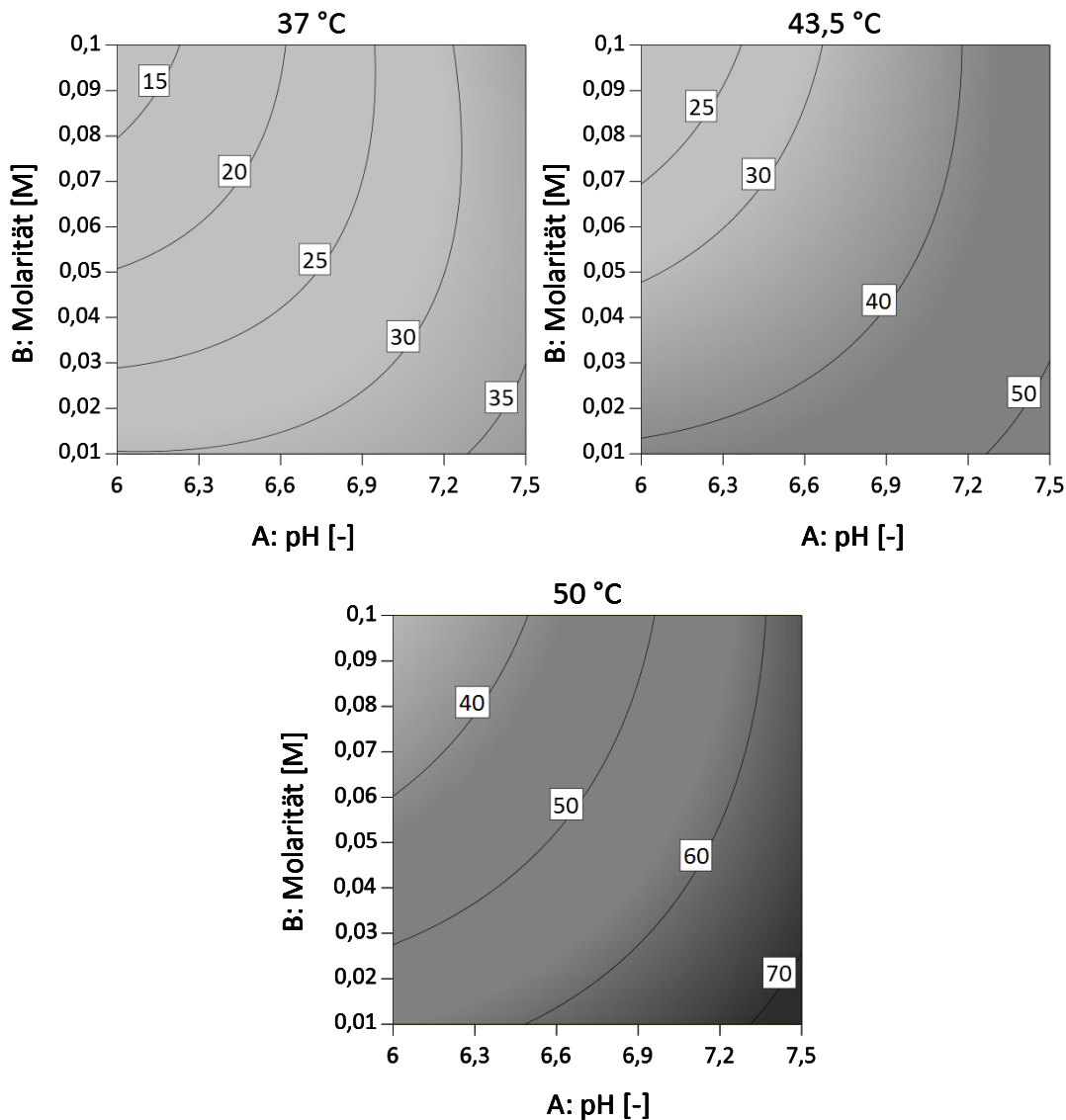


Abbildung 12 Konturplots der Antwortvariable  $Y_2$  – Glucosekonzentration nach 60 min. Konturplots zeigen den Einfluss der Molarität und des pH-Wertes bei a) 37 °C b) 43,5 °C und c) 50 °C. Die Einheit der gegebenen Werte ist mmol/L. Die Laminaribioseproduktion wurde mit 0,04 g Immobilisaten in 2 mL 0,2 mol/L Fructose bestimmt.

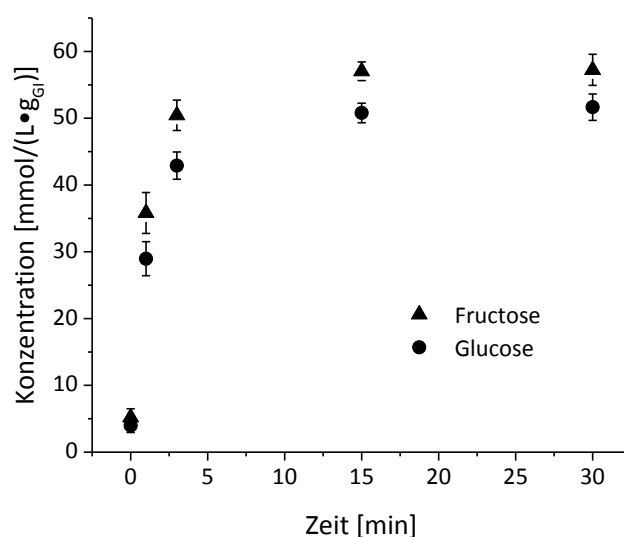


Abbildung 13 Diffusion von Fructose und Glucose aus GI-Granulat. Versuche wurden mit 0,07 g GI in 4 mL 0,05 M NaP-Puffer (pH 6,3) bei 37 °C durchgeführt. (N = 3).

#### 5.2.2.4 Vergleich optimaler Bedingungen der Enzyme und Festlegung trienzymatischer Bedingungen

Die Einschränkung eines *one-pot*-Prozesses besteht darin, dass die Bedingungen für jede Reaktion (wie Medium, Temperatur, pH und Katalysatorstabilität) gut ausbalanciert und für maximale Produktivität optimiert sein sollten [132]. Um die Optimalbedingungen der Reaktionen bzw. Enzyme vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Regressionsgleichungen ( $Y_1$  und  $Y_2$ ) gelöst (Kapitel 4.2.9).

Der Vergleich der Optimierungsergebnisse in Tabelle 31 zeigt, dass es keine Übereinstimmung bei den Bedingungen gibt, unter denen die Enzyme im untersuchten Bereich die gewünschte Aktivität und Stabilität zeigen. Während SP und LP leicht saure pH-Werte bevorzugen, liegt der optimale pH-Wert von GI mit pH 7,5 im leicht alkalischen Bereich. Bei den Molaritäten des Puffers bevorzugen GI und LP eher niedrige Molaritäten, während für SP hohe Molaritäten nötig sind, um die Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes so weit möglich zu verhindern. Am weitesten auseinander liegen die Optimaltemperaturen im untersuchten Bereich. Während die Optimaltemperaturen der Phosphorylasen mit 37 °C am unteren Ende der überprüften Temperaturskala liegen, befindet sich GI mit 50 °C am oberen Ende der Temperaturskala.

Tabelle 31 Ergebnis der Optimierung der Reaktionsbedingungen für LP- und SP-Sepabeads und GI-Granulat.

Enzym	A: pH [-]	B: Molarität [M]	C: Temperatur [°C]
SP	6,82	0,08	37
GI	7,5	0,01	50
LP	6,33	0,04	37

Da die bestimmten Optimalbedingungen der drei Enzyme sehr weit auseinanderliegen, wurden die trienzymatischen Bedingungen so gewählt, dass sich eine hohe Übereinstimmung mit den Optimalbedingungen des Schlüsselenzyms LP ergibt.

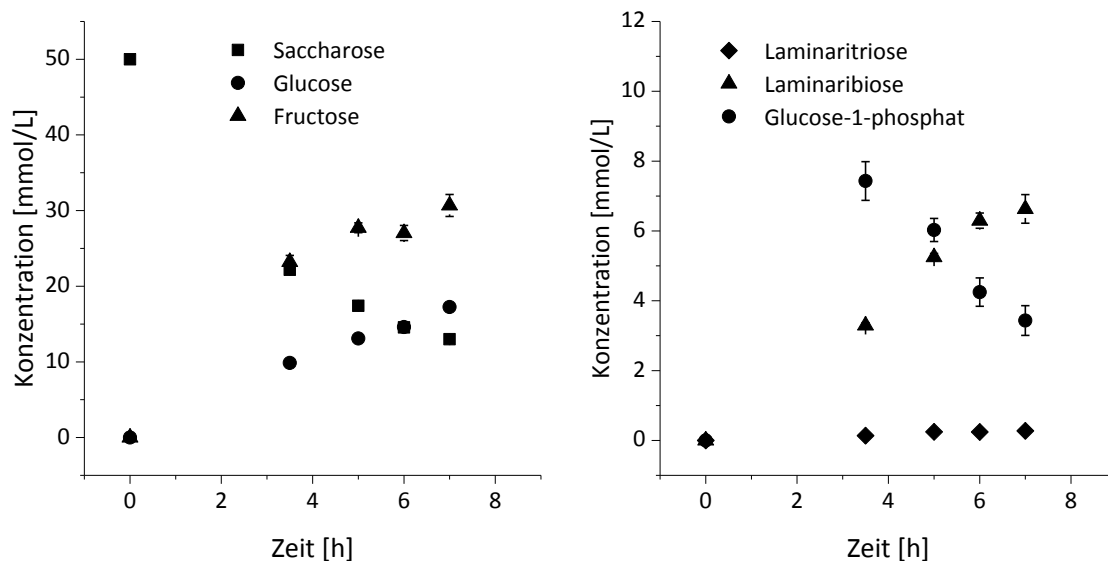
Als Bedingungen für das trienzymatische System wurde ein **0,05 M Natriumphosphatpuffer** mit einem **pH-Wert von 6,3** und eine **Reaktionstemperatur von 37 °C** festgelegt. Die Molarität des Puffers wurde im Vergleich zu den LP-Optimumsbedingungen leicht angehoben, um die Hydrolyse des  $\beta$ -

Glycosylenzymkomplexes zu verringern. Da der Einfluss der Molarität auf LP im Vergleich zum Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur sehr gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich das nicht oder nur minimal auf die Aktivität der LP auswirkt. Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der SP und vor allem der GI unter den gewählten Bedingungen reduziert.

Die starke Verringerung der Aktivität von GI führt dazu, dass sehr große Mengen des Granulats für ein trienzymatisches System verwendet werden müssen. Dies könnte aufgrund stark unterschiedlicher Partikelgrößen zu Schwierigkeiten bei der Durchmischung bzw. zu Entmischung im Reaktor führen.

Aufgrund dieser Herausforderungen und der sich stark unterscheidenden Optimalbedingungen wurde zunächst überprüft, ob die Enzyme gemeinsam aktiv sind und es zur Produktbildung kommt. Hierzu wurden zum einen trienzymatische Versuche im Mikroreaktionsgefäß ( $V_R = 1,8 \text{ mL}$ ) durchgeführt und zum anderen exemplarisch das Verhalten des trienzymatischen Systems in einem diskontinuierlichen Rührreaktor ( $V_R = 25 \text{ mL}$ ) untersucht.

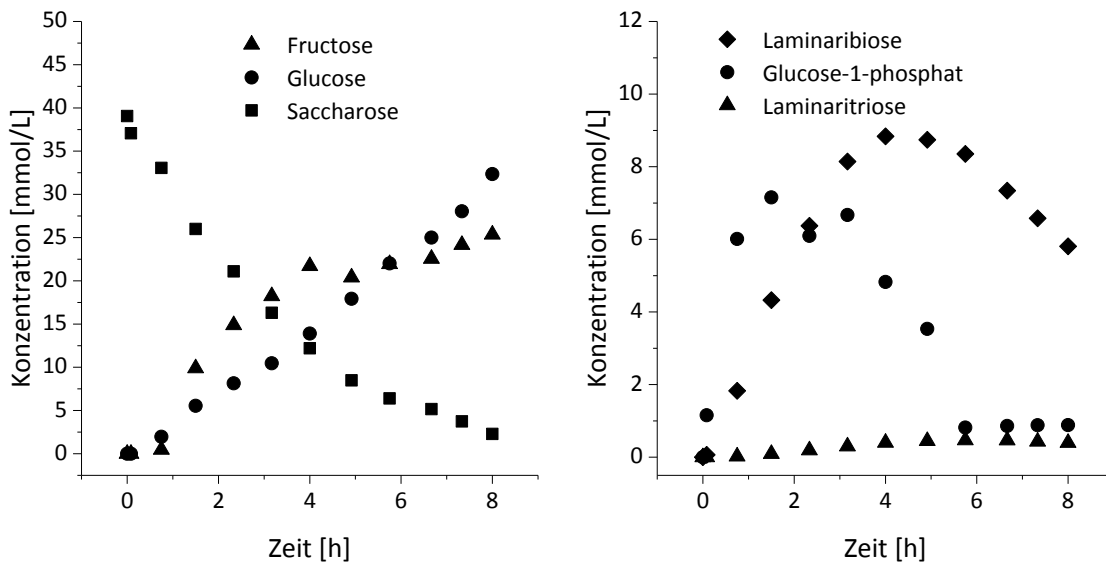
Abbildung 14 zeigt den Reaktionsverlauf im trienzymatischen System im Mikroreaktionsgefäß über sieben Stunden. Die Bildung von Laminaribiose beweist, dass das System unter den gewählten Bedingungen funktioniert, wobei es nicht zu einem vollständigen Umsatz der Saccharose kommt. So sind am Ende des Versuches noch  $13 \text{ mmol/L}$  Saccharose vorhanden. Die Substratumsetzung ist in den ersten 3 Stunden zunächst sehr hoch bevor sie sich verlangsamt. Mit der Umsetzung der Saccharose steigt die Fructosekonzentration an, wobei die Endkonzentration von  $30 \text{ mmol/L}$  zeigt, dass weniger als 20 % der Fructose zu Glucose isomerisiert wird. Der Verlauf der Glucosekurve ähnelt der der Fructosekurve, nur ist er flacher. Die Massenbilanz zeigt aber, dass während der Reaktion immer mehr Glucose vorhanden ist als allein über Isomerisierung von Fructose theoretisch gebildet werden kann. Fast 60 % der am Ende der Reaktion vorhandenen Glucose stammt aus der Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes oder es handelt sich um Glucose, die aus dem Granulat diffundiert ist. Die Isomerisierung von Fructose zu Glucose ist eine reversible Reaktion, die auf ein Gleichgewicht hinstrebt. Dieses Gleichgewicht ist temperaturabhängig. So bestimmte Takasaki [232] für die Gleichgewichtskonstante  $K$  ( $K = [\text{Fructose}]/[\text{Glucose}]$ ) der Glucoseisomerase-Reaktion Werte von 0,81 und 1 für  $25^\circ\text{C}$  bzw.  $60^\circ\text{C}$ . Das Verhältnis von Fructose zu Glucose im trienzymatischen System liegt gegen Ende der Reaktion bei 1,8, also noch weit vom Gleichgewicht entfernt. Eine Erhöhung des Anteils an Glucoseisomerase könnte also zu einer Verbesserung der Ausbeute führen. Die Produktion von Laminaribiose mit einem trienzymatischen System ist dennoch erfolgreich, wie die Bildung von  $6,63 \text{ mmol/L}$  Laminaribiose zeigt. Damit liegt die Ausbeute bei 13,3 %. Die Laminaribiosekonzentration steigt in den ersten sechs Stunden linear an und erhöht sich in der letzten Stunde kaum noch. Die Laminaritriosebildung ist mit einer maximalen Konzentration von  $0,3 \text{ mmol/L}$  gering. Die Glucose-1-phosphatkonzentration steigt in den ersten drei Stunden stark an und sinkt danach kontinuierlich wieder ab. Der starke Anstieg zu Beginn lässt sich durch eine zunächst geringe Glucosekonzentration erklären, da erst nach der Bildung von Glucose Glucose-1-phosphat von LP zur Bildung von Laminaribiose verwendet werden kann. Zu dem Abfall der Glucose-1-phosphatkonzentration kommt es durch gleichzeitige Bildung von Laminaribiose und höheren Oligosacchariden. Zusätzlich lässt sich der Abfall auch durch eine Rückreaktion des Glucose-1-phosphats zum  $\beta$ -Glycosylenzymkomplex und dessen Hydrolyse erklären.



**Abbildung 14** Reaktionsverlauf im trienzymatischen System mit 0,054 g LP, 0,015 g GI und 0,043 g SP mit 1,8 mL 50 mmol/L Saccharose als Substrat gelöst in 0,05 M Na-P-Puffer (pH 6,3). Die Reaktion wurde bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 1000 UpM durchgeführt. (N = 4).

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die trienzymatische Produktion von Laminaribiose in Mikroreaktionsgefäßen möglich ist, wurde der Maßstab vergrößert und die Reaktion exemplarisch in einem diskontinuierlichen Rührkessel durchgeführt. Dabei sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Immobilisate für den Einsatz im Rührkessel stabil genug sind und ob die unterschiedliche Größe der Immobilisate zu Problemen führt. Eine Wiederholung des Versuchs im Rührkessel mit denselben Immobilisaten sollte zusätzlich Hinweise auf die Wiederverwendbarkeit und Stabilität der Enzyme liefern.

Abbildung 15 zeigt den Reaktionsverlauf im trienzymatischen System im diskontinuierlichen Rührkessel. Zunächst wird deutlich, dass die Saccharose in den acht Stunden fast vollständig abgebaut wird und die Glucose- und Fructosekonzentration stark ansteigen. Nach sechs Stunden hat Glucose eine höhere Konzentration als Fructose erreicht. Dies zeigt, dass Glucose nicht allein aus der Isomerisierung von Fructose stammen kann. Während in den ersten Stunden das Gleichgewicht zwischen Fructose und Glucose auf Seiten der Fructose liegt, kommt es nach vier Stunden langsam zu einer Verschiebung in Richtung Glucose. Das bedeutet wiederum, dass Glucoseisomerase Glucose zu Fructose umsetzt. Die Unterschiede zum ersten trienzymatischen System lassen sich durch die deutliche Erhöhung der GI im Verhältnis zu SP erklären. Bei Reaktionsverlauf der Laminaribiose ist auffällig, dass nach vier Stunden eine maximale Konzentration von 8,9 mmol/L erreicht wird und die Konzentration anschließend stark abfällt. Die Kurve der Konzentration von Glucose-1-phosphat zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf. Sie erreicht ihr Maximum allerdings bereits nach zwei Stunden. Der verstärkte Anstieg der Glucosekonzentration zusammen mit dem Abbau der Laminaribiose könnte darauf hindeuten, dass es zur Rückreaktion kommt, also der Bildung von Glucose und Glucose-1-phosphat aus Laminaribiose. Die Abnahme der Glucose-1-phosphatkonzentration lässt sich durch eine ausgeprägte Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes erklären. Zusätzlich wird bis zu 0,5 mmol/L Laminaritriose gebildet, wobei es auch hier nach sechs Stunden zu einem leichten Abbau kommt. Damit ist eine weitere mögliche Erklärung für einen Abbau von Laminaribiose und Laminaritriose eine starke Bildung von höheren Oligosacchariden ( $N > 3$ ).



**Abbildung 15** Reaktionsverlauf im trienzymatischen System mit 1,68 g LP, 1,40 g GI und 0,8 g SP mit 25 mL 50 mmol/L Saccharose als Substrat, gelöst in 0,05 M Na-P-Puffer (pH 6,3). Die Reaktion wurde bei 37 °C und einer Rührergeschwindigkeit von 700 UpM durchgeführt.

Die Wiederholung des trienzymatischen Systems musste aufgrund von Bakterienwachstums abgebrochen werden. Eigene Ergebnisse (nicht gezeigt) und Untersuchungen innerhalb des Projektes [233] haben gezeigt, dass die Kontaminationen mit Bakterien durch die verwendete Glucoseisomerase verursacht werden. Das Enzym ist auf die Anwendung im HFCS-Prozess und damit Reaktionstemperaturen um 55 °C optimiert. Unter diesen Bedingungen kommt es im Gegensatz zum Einsatz bei 37 °C nicht zum Wachstum von Bakterien [233].

Mit den vorgestellten trienzymatischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Laminaribiose unter den gewählten Bedingungen prinzipiell möglich ist. Allerdings wird auch deutlich, dass ein trienzymatisches System mit der zur Verfügung stehenden GI nicht sinnvoll ist. Aufgrund der geringen Aktivität der GI bei 37 °C müssten große Mengen GI eingesetzt werden, um eine ausreichend hohe Isomerisierungsrate zu erreichen. Aufgrund der hohen Hydrolyserate der zur Verfügung stehenden SP ist teilweise mehr Glucose als Fructose im Reaktor vorhanden, was dazu führt, dass es bereits zu einer Isomerisierung von Glucose zu Fructose durch GI kommt (vgl. Trienzymatisches System im Rührkessel). Aus diesen Gründen wurde statt der Entwicklung eines trienzymatischen Systems die bienzymatische Produktion von Laminaribiose mit SP und LP und Glucose als Cosubstrat weiterverfolgt.

### 5.2.3 Charakterisierung der Enzyme unter multienzymatischen Bedingungen

Auf multienzymatische Prozesse wirken eine Vielzahl von Einflussfaktoren, die sich gegenseitig beeinflussen. Die Entwicklung eines erfolgreichen Herstellungsprozesses wird dadurch entsprechend aufwendiger und komplexer. Zielführend ist daher eine ausführliche Charakterisierung der Enzyme hinsichtlich ihrer Kinetik und Stabilität unter Prozessbedingungen und die Entwicklung eines mathematischen Modells, mit dessen Hilfe Prozessvarianten wie verschiedene Enzymverhältnisse und Substratkonzentrationen am Computer simuliert und damit der experimentelle Aufwand verringert werden kann.

### 5.2.3.1 Stabilität und Wiederverwendbarkeit von SP und LP

Zur Bestimmung der Stabilität der Enzyme wurden diese in Prozesspuffer bei 37 °C inkubiert und die Restaktivität nach regelmäßigen Zeitintervallen bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 16 zeigen, dass die Immobilisierungsmethode im Fall von LP keinen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms hat. Das native Enzym hat eine Halbwertszeit von  $8,7 \pm 0,7$  h, das immobilisierte Enzym eine von  $8,9 \pm 1,5$  h. Das Ergebnis steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Cerdobbel et al. [201], die eine Verringerung der Stabilität unter Prozessbedingungen nach kovalenter Multipunktimmobilisierung beobachtet haben. Die SP-Sepabeads sind unter den Prozessbedingungen etwas weniger stabil. Sie weisen eine Halbwertszeit von  $7,1 \pm 0,5$  h auf. Die Stabilität der nativen SP wurde aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit nicht untersucht.

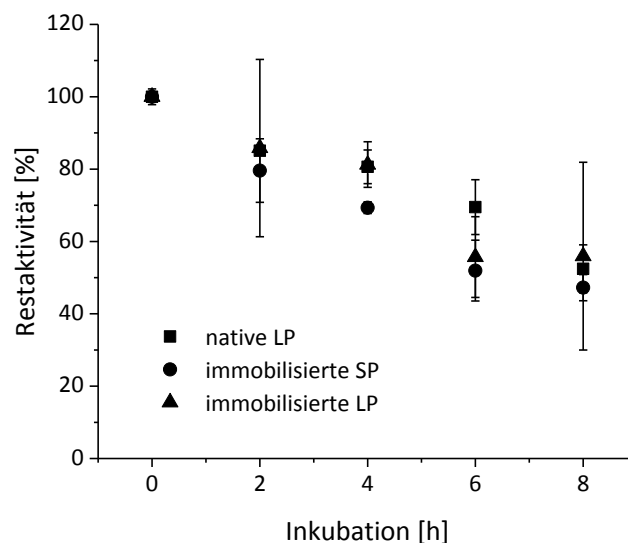
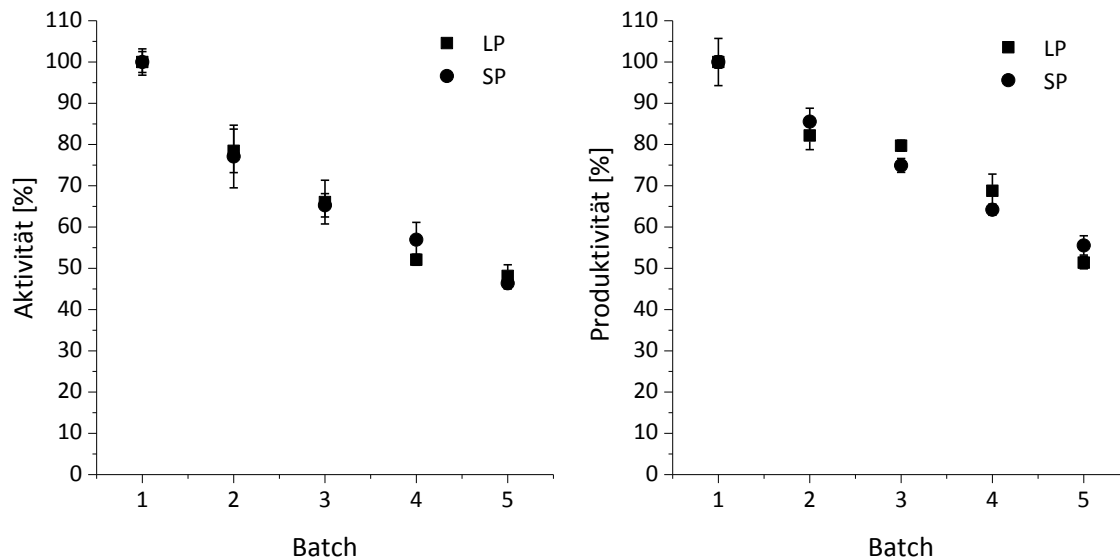


Abbildung 16 Stabilität nativer LP (N = 3) und immobilisierter SP (N = 3) und LP (N = 2) bei 37 °C. Die Enzyme wurden bei 37 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) inkubiert und nach 0, 2, 4, 6 und 8 h auf ihre Restaktivität getestet. Substrat war 0,2 mol/L Saccharose für SP, 0,05 mol/L Glucose und 0,075 mol/L Glucose-1-phosphat für LP. Die Substrate lagen in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) gelöst vor, das Substrat des nativen Enzyms wurde in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) gelöst. 100 µl der nativen Enzymlösung oder 0,04 g der Immobilisate wurden in Aktivitätstests mit einem Volumen von 1,8 mL eingesetzt. Nach [229].

Bei einem Einsatz im bienzymatischen System zur Produktion von Laminaribiose würden die Enzyme allerdings nicht allein in Puffer vorliegen, sondern auch Intermediate, Substrate und Produkte vorhanden sein. Aus diesem Grund wurde die Wiederverwendbarkeit der Enzymimmobilisate in fünf aufeinanderfolgenden Batchversuchen über jeweils fünf Stunden untersucht. In Abbildung 17 ist erkennbar, dass die Abnahme der Produktivität (Gesamtproduktion nach 5 h) und der Aktivität (Anfangsgeschwindigkeit) in den aufeinanderfolgenden Batchexperimenten sehr ähnlich verläuft. Wie bereits in Abbildung 16 erkennbar, sind die LP- und SP-Immobilisate ähnlich stabil. Im Hinblick auf die weitere Prozessentwicklung ist das von Vorteil, da die Katalysatoren gleich lang eingesetzt werden können. SP weist hier eine Halbwertszeit von  $18,0 \pm 0,7$  h auf; LP eine Halbwertszeit von  $16,9 \pm 0,8$  h. Damit hat sich die Halbwertszeit im Fall von LP in diesen Versuchen beinahe verdoppelt und im Fall von SP sogar mehr als verdoppelt. Die Erhöhung der Halbwertszeit lässt sich durch die Anwesenheit der Substrate erklären. Solche stabilisierenden Effekte von Substraten sind bereits seit Längerem bekannt. Als Grund für die Reduzierung der wärmeinduzierten Denaturierung von Enzymen wird eine Konformationsänderung oder „Konformationsstraffung“ durch die Bindung des Liganden an die native

Konformation des Enzyms diskutiert [234]. Im Fall von SP ist der stabilisierende Effekt des Substrats stärker ausgeprägt und wurde von De Winter et al. [235] für eine SP aus *Bifidobacterium adolescentis* immobilisiert auf Sepabeads EC-HFA ebenfalls beschrieben.



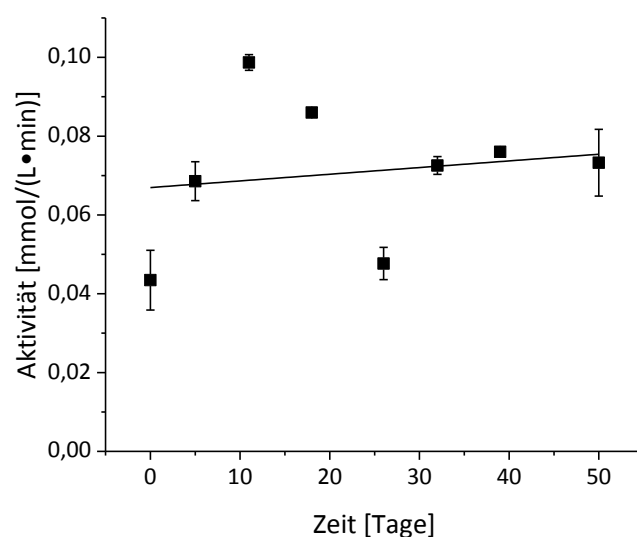
**Abbildung 17 Wiederverwendbarkeit/Operative Stabilität von SP- und LP-Sepabeads in 5 aufeinanderfolgenden 5-stündigen Batchexperimenten bei 37 °C.** Aktivität (Anfangsgeschwindigkeit) und Produktivität und der Enzyme wurden als Indikator für die operative Stabilität verwendet. Die Substrate waren 0,2 mol/L Saccharose für SP und 0,05 mol/L Glucose und 0,075 mol/L Glucose-1-phosphat für LP. Die Substrate lagen in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6,3) vor. Es wurde stündlich 15 µl Probe genommen. (N = 3).

In Abbildung 17 zeigt sich ein besonders starker Abfall der Aktivität (links) nach dem ersten Batch. So ist die Anfangsgeschwindigkeit beider Enzymimmobilisate im zweiten Batch um 20 % geringer. In den weiteren drei Batchexperimenten ist der Abfall weniger stark ausgeprägt. Ein Grund für den größeren Verlust an Aktivität könnte ein Ablösen nur schwach gebundener Enzyme (*one-point* statt *multi-point*) von den Trägern während des ersten Batch sein. Die Produktivität (rechts) in den Batchexperimenten zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Aktivität. Allerdings ist der Unterschied zwischen der Produktivität im ersten und zweiten Batch weniger ausgeprägt. Der Grund dafür ist, dass die Enzyme gegen Ende des ersten Batchexperiments aufgrund von Substratlimitierung bereits außerhalb ihrer maximalen Geschwindigkeit arbeiten. Im Fall von LP bedeutet das zusätzlich eine verringerte Oligosaccharidbildung, was wiederum dazu führt, dass die Laminaribioseproduktion in Batch 2 und 3 ähnlich hoch ist.

Die SP- und LP-Immobilisate weisen somit eine gute Wiederverwendbarkeit und ausreichende Stabilität für die Entwicklung eines Batchprozesses auf.

Zur Bestimmung der Stabilität während der Lagerung wurden LP-Sepabeads bei 4 °C in Prozesspuffer gelagert und regelmäßig auf ihre Restaktivität überprüft. Abbildung 18 zeigt, dass die Aktivität der Immobilisate über 50 Tage zwar stark streut, sie insgesamt jedoch keine Aktivität verlieren und demnach bei 4 °C sehr stabil sind. Da damit bereits stabile Lagerungsbedingungen gefunden wurden, wurden keine weiteren Lagerungsversuche durchgeführt. Aufgrund der sehr ähnlichen Stabilitätseigenschaften von LP und SP wurde angenommen, dass SP-Sepabeads unter den gleichen Bedingungen ebenfalls stabil sind.





**Abbildung 18 Lagerung von LP-Sepabeads über 50 Tage.** LP-Sepabeads wurden bei 4 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden 0,04 g Sepabeads entnommen und mit 2 mL 0,05 mol/L Glucose und 0,075 mol/L Glucose-1-phosphat in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) ihre Restaktivität bestimmt. (N = 2). [Linearer Fit  $y = 1,69E-4x + 0,07$  (Residual Sum of Squares 0,002; Pearson's  $r$  0,16; Adj. R-Square -0,14)].

### 5.2.3.2 Exkurs: Untersuchung weiterer kovalenter Träger auf höhere Stabilität und bessere Wiederverwendbarkeit

Da die Stabilität und Wiederverwendung der Enzyme für die weitere Prozessentwicklung entscheidend ist, wurde überprüft, ob die auf ECR-Trägern immobilisierten Enzyme eine höhere Stabilität und Wiederverwendbarkeit zeigen als die auf Sepabead immobilisierten Enzyme. Zur besseren Verständlichkeit werden Lifetech ECR8209 M im Folgenden als Epoxyträger und Lifetech ECR8309 M als Aldehydträger bezeichnet.

Für beide Träger wurde die Immobilisierungsmethode zunächst für LP optimiert und anschließend auf ihre Anwendbarkeit für SP getestet. Die Immobilisate wurden analog zu den Sepabead-Immobilisaten charakterisiert, Bedingungen für ein multienzymatisches System festgelegt und ihre Stabilität unter diesen Bedingungen bestimmt und mit der der Sepabead-Immobilisate verglichen.

Die Optimierung der Immobilisierung ergab, dass die Enzyme für die Immobilisierung auf Epoxyträgern in einem 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) vorliegen sollten, für die Immobilisierung auf Aldehydträgern in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2). Die höchste Effizienz bezogen auf die Aktivität kann bei Immobilisierung mit einem Verhältnis von 1  $g_{\text{Träger}}/4 \text{ mL}_{\text{Enzym}}$  erzielt werden. Unter diesen Bedingungen kann LP mit 30 % Restaktivität auf Epoxyträgern bzw. 16 % Restaktivität auf Aldehydträgern immobilisiert werden. Bei Immobilisierung von SP bleibt 8 % Aktivität auf Epoxyträgern und 5,5 % auf Aldehydträgern erhalten.

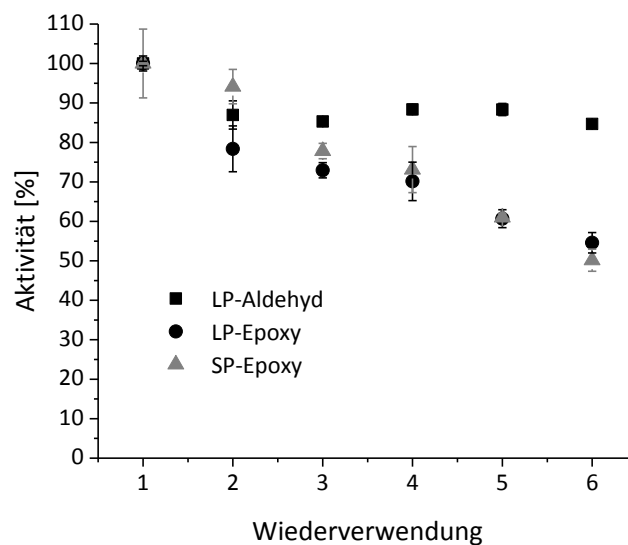
Nach Charakterisierung der Immobilisate analog zu den Sepabeadimmobilisaten wurden für **Epoxyträger 0,03 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)** und **41 °C** als Prozessbedingungen für die multienzymatische Umsetzung festgelegt und für **Aldehydträger 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,1)** und **41 °C**.

Für den Test der Immobilisate im bienzymatischen System wurden Bedingungen gewählt, die bei Verwendung von Sepabeadimmobilisaten zu 20 % Laminaribiosebildung geführt haben (0,8 U SP, 0,9 U LP 0,2 M Sac 0,016 M Glu entspricht 0,03 g SP-Sepabeads, 0,1 g LP-Sepabeads). Aufgrund der größeren Partikel der Epoxy- und Aldehydimmobilisate musste das Probenvolumen jedoch von 1,8 auf 4 mL erhöht werden.

Im Fall von Epoxyimmobilisaten wurde eine Ausbeute von 8 % erreicht, mit Aldehydimmobilisaten eine von 3 %. Die Erhöhung des Probenvolumens um den Faktor 2,2 verringert die Ausbeute um den gleichen Faktor. Zum Vergleich mit Sepabeadimmobilisaten wird daher bei Epoxyimmobilisaten von einer Ausbeute von ca. 18 % ausgegangen, bei Aldehydimmobilisaten von ca. 7 %. Damit können beim Einsatz von ECR8209 M-immobilisierten Enzymen ähnliche Ausbeuten wie mit Sepabead-immobilisierten Enzymen erreicht werden. Im Fall von Aldehydimmobilisaten geht die geringere Ausbeute mit einer verstärkten Glucosebildung also Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes einher. Es wird somit kaum Glucose-1-phosphat gebildet, das zur Laminaribiosebildung zur Verfügung steht. Damit führt eine Bindung von SP über Glutardialdehyd auf ECR8309 M zu einer Verstärkung der Hydrolyse. Die Immobilisierung von SP auf Aldehydträgern ist daher nicht sinnvoll und die Immobilisierung von SP auf Aldehydträgern bzw. die Immobilisate wurden nicht weiter untersucht.

Die Stabilität der verbleibenden Immobilisate wurde durch wiederholten Einsatz in Aktivitätstests bestimmt. Dabei können mehrere Faktoren gleichzeitig untersucht werden. Durch die zwischenzeitliche Lagerung in Puffer bei 4 °C wird die Widerstandsfähigkeit des Enzyms gegenüber Temperatur und Mediumsveränderungen (Substrat, kein Substrat) untersucht und durch die wiederholte Aktivitätsbestimmung wird die Stabilität bei Prozesstemperatur untersucht. Die über eine Wiederverwendung bestimmte Halbwertszeit sollte damit eher der Halbwertszeit unter Prozessbedingungen entsprechen bzw. die operative Stabilität der Katalysatoren am besten beschreiben.

Abbildung 19 zeigt die Veränderung der Aktivität der LP-Aldehyd- und LP-Epoxyimmobilisate sowie die der SP-Epoxyimmobilisate. Bei LP-Immobilisaten nimmt die Aktivität vom ersten zum zweiten Einsatz am stärksten ab. Das deutet darauf hin, dass es zu einem Verlust an Aktivität durch Abrieb kommt. Bei SP-Epoxyimmobilisaten nimmt die Aktivität gleichmäßiger ab, was auf eine stabilere Bindung des Proteins an den Träger hinweist. Die Aktivität der Epoxyimmobilisate nimmt insgesamt rascher ab als die Aktivität der Aldehydimmobilisate. So schwankt die Aktivität der LP-Aldehydimmobilisate nach der anfänglich starken Verringerung um Werte zwischen 84 und 88 %. Die Aldehydimmobilisate sind damit deutlich stabiler als die Epoxyimmobilisate. Das zeigt sich ebenfalls an den Halbwertszeiten der Enzyme, so haben LP-Aldehydimmobilisate eine Halbwertszeit von  $30,5 \pm 16,9$  h, LP-Epoxyimmobilisate eine von  $6,1 \pm 0,8$  h und SP-Epoxyimmobilisate eine von  $5,3 \pm 0,5$  h. Wie bereits bei Immobilisierung auf Sepabeads zeigen SP und LP damit eine ähnliche Stabilität bei Immobilisierung auf Trägern mit Epoxygruppen als funktionellen Gruppen. Im Vergleich zu Sepabeads ist die Stabilität jedoch geringer. So lagen die Halbwertszeiten von Sepabeadimmobilisaten in Anwesenheit von Substrat unter Prozessbedingungen bei  $18,0 \pm 0,7$  h (SP) bzw.  $16,9 \pm 0,8$  h (LP). Die Prozesstemperatur ist hier um 4 °C höher als bei Sepabeads. Daher ist es zu erwarten, dass sich die Halbwertszeiten bei 37 °C annähern.



**Abbildung 19** Wiederverwendbarkeit/Operative Stabilität von LP-Aldehydimmobilisaten und LP Epoxyimmobilisaten sowie SP-Epoxyimmobilisaten in 6 aufeinanderfolgenden 1-stündigen Batchexperimenten bei 41 °C. Es wurden 0,1 g Immobilisate eingesetzt. Die Substrate waren 0,045 mol/L Saccharose für SP und 0,06 mol/L Glucose und Glucose-1-phosphat für LP. Die Substrate lagen für Aldehydimmobilisate in 0,025 M NaP-Puffer (pH 6,1) vor; für Epoxyimmobilisate in 0,05 M NaP-Puffer (pH 6). Es wurde stündlich 15 µl Probe genommen. (N = 3). Die Probenahme erfolgte nach 0, 20, 30, 40, 50 und 60 min.

Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den auf Sepabeads und ECR8209 M-Trägern immobilisierten Enzymen gering. Trotz der besseren Filtrierbarkeit von ECR8209 M-Trägern wurden Sepabeads vorgezogen da bei der Immobilisierung deutlich mehr Aktivität der nativen Enzyme (4 Mal LP, 3 Mal SP) erhalten bleibt. Bei der Immobilisierung von LP auf ECR8309 M Trägern nach Voraktivierung mit Glutardialdehyd muss ein noch größerer Verlust an Aktivität bei der Immobilisierung in Kauf genommen werden. Die operative Stabilität der Immobilisate ist dafür etwa doppelt so hoch wie die von LP-Sepabeads. Da eine Immobilisierung von SP auf Aldehydimmobilisaten allerdings aufgrund der nochmals stärker ausgeprägten Hydrolyse nicht in Frage kommt, sind die Aldehydimmobilisate nicht weiter von Interesse für den zu untersuchenden Prozess. Damit wird das Ergebnis des Screenings, dass es sich bei Sepabeads EC-EP/S um die geeigneten Träger handelt, nochmals bestätigt.

### 5.2.3.3 Kinetik

Mathematische Modelle sind aufgrund der Komplexität multienzymatischer Systeme im Rahmen der Prozessgestaltung sehr hilfreich, da Modellierungen und Simulation Zeitersparnis und Reduzierung des experimentellen Aufwands bedeuten [9]. Um das Verhalten der Enzyme im bienzymatischen System vorhersagen zu können, wurde die Kinetik der einzelnen Enzyme genauer untersucht. Das Ziel dabei war es, die Reaktionen der Enzyme ausreichend genau beschreiben zu können, um das Verhalten des bienzymatischen Systems abschätzen zu können.

#### 5.2.3.3.1 Sucrosephosphorylase

Sucrosephosphorylase ist in der Lage, eine Reihe von Reaktionen zu katalysieren. Die vorangegangenen Untersuchungen mit SP zeigten, dass die verwendete SP unter den gewählten Bedingungen vor allem zwei Reaktionen katalysiert: die Phosphorolyse von Saccharose und die Hydrolyse von Saccharose. Als Reaktionsmechanismus wurde ein Ping-Pong Mechanismus identifiziert. Dabei wird nach Bindung der Saccharose zunächst Fructose abgespalten und es verbleibt ein  $\beta$ -

Glycosylenzymkomplex. Der Glycosylrest des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes kann nun auf Phosphat oder einen anderen Akzeptor übertragen werden. Im Falle einer Übertragung auf Phosphat wird Glucose-1-phosphat gebildet. Diese Reaktionen sind reversibel. Die Hydrolyse des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes führt zur Bildung von Glucose und ist irreversibel. Da Wasser als Reaktionspartner bei der Hydrolyse im Überschuss vorliegt, wurde die Hydrolyse über eine Michaelis-Menten-Kinetik erfasst. Es ergaben sich die folgenden Reaktionsgleichungen.

$$-\frac{d[\text{Sac}]}{dt} = \frac{v_{\max, \text{S-Phos}} [\text{Sac}] [\text{P}]}{K_{\text{M, Sac}} [\text{P}] + K_{\text{M, P}} [\text{Sac}] + [\text{Sac}] [\text{P}]} + \frac{v_{\max, \text{S-Hyd}} [\text{Sac}]}{K_{\text{M, Sac}} + [\text{Sac}]} \quad (18)$$

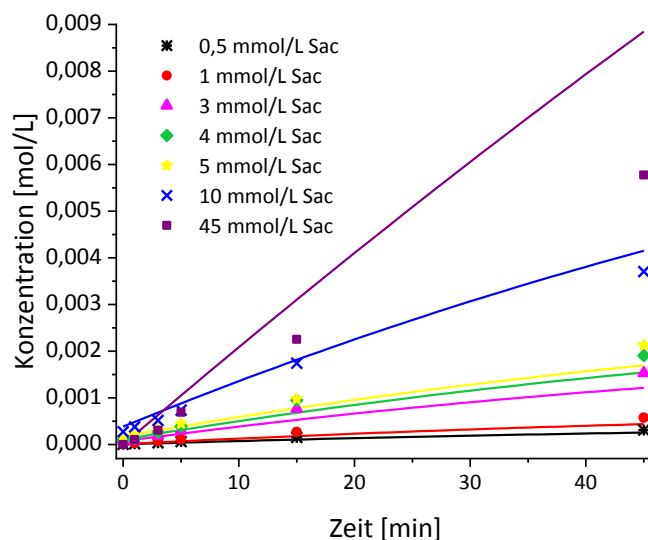
$$-\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{v_{\max, \text{S-Phos}} [\text{Sac}] [\text{P}]}{K_{\text{M, Sac}} [\text{P}] + K_{\text{M, P}} [\text{Sac}] + [\text{Sac}] [\text{P}]} \quad (19)$$

$$\frac{d[\text{G1P}]}{dt} = \frac{v_{\max, \text{S-Phos}} [\text{Sac}] [\text{P}]}{K_{\text{M, Sac}} [\text{P}] + K_{\text{M, P}} [\text{Sac}] + [\text{Sac}] [\text{P}]} \quad (20)$$

$$\frac{d[\text{Fru}]}{dt} = \frac{v_{\max, \text{S-Phos}} [\text{Sac}] [\text{P}]}{K_{\text{M, Sac}} [\text{P}] + K_{\text{M, P}} [\text{Sac}] + [\text{Sac}] [\text{P}]} + \frac{v_{\max, \text{S-Hyd}} [\text{Sac}]}{K_{\text{M, Sac}} + [\text{Sac}]} \quad (21)$$

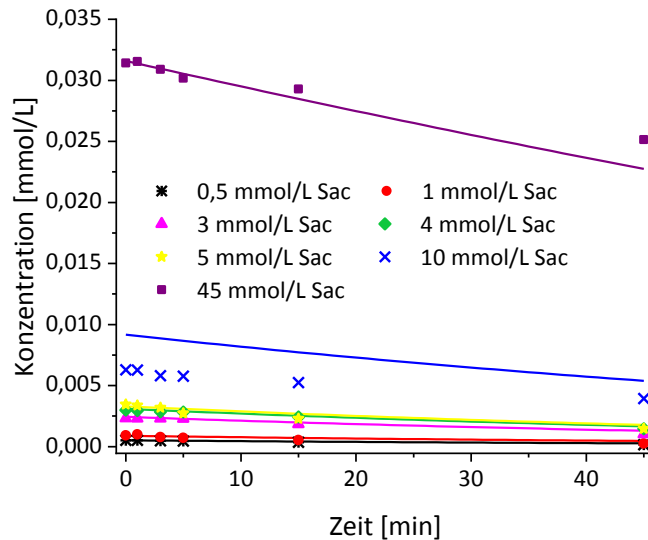
$$\frac{d[\text{Glc}]}{dt} = \frac{v_{\max, \text{S-Hyd}} [\text{Sac}]}{K_{\text{M, Sac}} + [\text{Sac}]} \quad (22)$$

Mit Hilfe des Programms ModelMaker 3 wurden experimentelle Daten zur Aktivität der SP-Sepabeads bei 0,05 M Phosphat und variablen Saccharosekonzentrationen an die Formeln gefittet. Abbildung 20 zeigt, dass die modellierten Verläufe der Fructosebildung die experimentellen Daten aus den Versuchen prinzipiell abbilden. Allerdings kommt es bei hohen Substratkonzentrationen zu einer deutlichen Überschätzung der Fructosebildung.



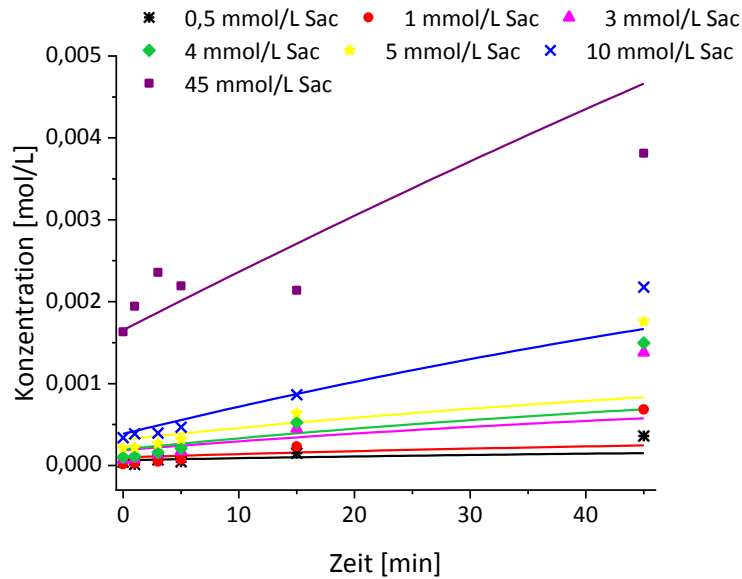
**Abbildung 20** Zeitverlauf der Bildung von Fructose bei Umsetzung von Saccharose mit SP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g SP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)].

Das Gleiche gilt für die Umsetzung von Saccharose in Abbildung 21. Da die Startkonzentrationen ebenfalls als Parameter definiert wurden, liegt der modellierte Verlauf bei 10 mmol/L Saccharose oberhalb der Messwerte.



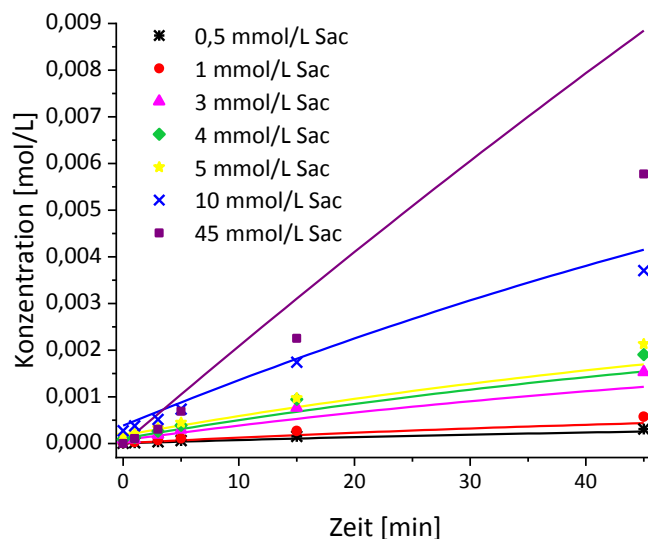
**Abbildung 21** Zeitverlauf der Umsetzung von Saccharose mit SP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g SP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)].

Dagegen wird die Bildung von Glucose in Abbildung 22 nur zu Beginn der Reaktion so gut wie Fructose und Saccharose abgebildet. Bei hohen Saccharosekonzentrationen lässt sich dies auf stark schwankende Messwerte zurückführen. Ansonsten wird die Glucosebildung in den ersten 15 min gut abgebildet, danach schlechter. Dies könnte bedeuten, dass es zu späteren Zeitpunkten aufgrund höherer Glucose-1-phosphatkonzentrationen zu Glucose-1-phosphathydrolyse kommt und die Beschreibung der Kinetik mit Phosphorolyse und Hydrolyse von Saccharose für eine sehr genaue Beschreibung nicht mehr ausreicht.



**Abbildung 22** Zeitverlauf der Bildung von Glucose mit SP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g SP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)].

Abbildung 23 zeigt, dass die Bildung von Glucose-1-phosphat – vergleichbar mit der Bildung von Fructose, mit Ausnahme des Versuchs mit 45 mmol/L – mit annehmbarer Genauigkeit beschrieben werden kann. Bei Modellierung des Systems wurde darauf geachtet, dass Glucose-1-phosphat mit möglichst hoher Genauigkeit beschrieben wird, da es sich um das Schlüsselintermediat im bienzymatischen System handelt. Eine weitere Verbesserung des Modells ließe sich durch Berücksichtigung der Reversibilität der Glucose-1-phosphatbildung erreichen. Die Anzahl der Versuche bzw. Messdaten ist dafür allerdings zu gering.



**Abbildung 23** Zeitverlauf der Bildung von Glucose-1-phosphat mit SP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g SP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)].

Für genauere Prozessuntersuchungen wäre es zudem sinnvoll, den Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen.

Die ermittelten kinetischen Parameter von Sucrosephosphorylase auf Sepabeads sind in Tabelle 32 zu finden.

**Tabelle 32 Kinetische Parameter von Sucrosephosphorylase auf Sepabeads.**

$K_{M,Sac}$ [mol/L]	$K_{M,P}$ [mol/L]	$v_{max,S-Phos}$ [mol/(g·min)]	$v_{max,S-Hyd}$ [mol/(g·min)]
5,044E-05	2,336E-18	1,005E-05	5,181E-06

Der  $K_M$ -Wert für den ersten Schritt der Reaktion, die Bindung von Saccharose ( $K_{M,Sac}$ ), ist für beide Reaktionen gleich, da es sich um denselben Reaktionsschritt handelt und die Unterscheidung zwischen Phosphorolyse und Hydrolyse erst nach der Freisetzung von Fructose bzw. der Bildung des  $\beta$ -Glycosylenzymkomplexes erfolgt. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse beträgt (85 %) der Phosphorolyse. Der  $K_M$ -Wert für Phosphat ist so gering (2,336e-18 mol/L), dass die Phosphorolyse bezüglich dieses Substrats immer bei maximaler Geschwindigkeit stattfindet. Es handelt sich bezogen auf Phosphat um eine Reaktion nullter Ordnung. Der gegen Null gehende Wert für  $K_{M,P}$  führt dazu, dass der Term  $K_{M,P} \cdot [Sac]$  aus den Reaktionsgleichungen für den Umsatz von Saccharose und Phosphat sowie die Bildung von Fructose praktisch Null wird und aus den Gleichungen heraus gestrichen werden kann. Die Aktivität bzw. das kinetische Verhalten des Enzyms unterscheidet sich stark von dem des nativen Enzyms [236]. Dies hat verschiedene Gründe: zum einen die unterschiedliche Form des Enzyms (nativ vs. immobilisiert), zum anderen unterschiedliche Reaktionsbedingungen (45 °C, 0,25 M Puffer und 37 °C, 0,05 M Puffer) sowie vor allem die Annahme unterschiedlicher Reaktionsmechanismen. So geht Zein [236] von Glucose-1-phosphathydrolyse aus. Da Saccharose im Vergleich zu Glucose-1-phosphat aber in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt, spielt die Hydrolyse von Saccharose eine größere Rolle. Aus diesem Grund wurde hier die Saccharosehydrolyse berücksichtigt. Die  $K_M$ -Werte für Saccharose liegen mit 0,7 mM und 0,05 mM deutlich auseinander. Mit der Immobilisierung hat sich damit die Affinität des Enzyms zu Saccharose erhöht. Die Geschwindigkeiten der Reaktionen lassen sich bei 8 K Temperaturunterschied kaum vergleichen.

#### 5.2.3.3.2 Laminaribiosephosphorylase

Bei der verwendeten Laminaribiosephosphorylase handelt es sich um einen aufkonzentrierten *E. gracilis* Rohextrakt. Dieser enthält neben Laminaribiosephosphorylase (EC 2.4.1.31) auch  $\beta$ -1,3-Oligoglucanphosphorylase (EC 2.4.1.30). Beide Enzyme katalysieren die Bildung von Laminaribiose aus Glucose und Glucose-1-phosphat sowie die Bildung höherer Oligosaccharide. Dabei bildet die Oligoglucanphosphorylase verstärkt Laminaritriose und höhere Oligosaccharide. Das Vorhandensein von mindestens zwei Enzymen erschwert die Erstellung einer Kinetik deutlich, da mehrere enzymatische Reaktionen gleichzeitig auftreten können, die gemeinsam beschrieben werden müssen. Es sind keine weiteren Phosphorylasen in *Euglena* bekannt, die Glucose-1-phosphat nutzen [211].

Zur Beschreibung der Kinetik von Laminaribiosephosphorylase existiert basierend auf einem geordneten sequentiellen bi-bi-Mechanismus eine Modellgleichung von Kitaoka et al. [206], die eine zusätzliche kompetitive Substrathemmung berücksichtigt. Dabei muss zunächst Glucose-1-phosphat binden, bevor es zur Bindung von Glucose oder Laminaribiose bzw. höheren Oligosacchariden kommt.

Das hier verwendete Modell basiert auf den Gleichungen von Kitaoka et al. [206]. Abweichend von Kitaoka et al. [206] wurde aber davon ausgegangen, dass Glucose als kompetitiver Inhibitor nur im

aktiven Zentrum bindet und nicht von einer weiteren Bindung von Glucose an regulatorische Stellen ausgegangen. Zur Beschreibung der Bildung höherer Oligosaccharide wurde die von Zein [236] postulierte Modellgleichung (2-Substratkinetik) mit einem Term für die kompetitive Hemmung der Bildung höherer Oligosaccharide durch Glucose erweitert. Es ergaben sich die folgenden Modellgleichungen:

$$-\frac{d[G1P]}{dt} = \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{I,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{I,G1P}K_{M,Glc}}{K_{I,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{I,1}}[Glc]^2} + \frac{v_{\max,Lam3}[Lam][G1P]}{\left(K_{M,Lam} + [Lam] + \frac{K_{M,Lam}}{K_{I,Glc}}[Glc]\right) \cdot (K_{M,G1P} + [G1P])} \quad (23)$$

$$-\frac{d[Glu]}{dt} = \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{I,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{I,G1P}K_{M,Glc}}{K_{I,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{I,1}}[Glc]^2} \quad (24)$$

$$\frac{d[Lam]}{dt} = \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{I,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{I,G1P}K_{M,Glc}}{K_{I,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{I,1}}[Glc]^2} - \frac{v_{\max,Lam3}[Lam][G1P]}{\left(K_{M,Lam} + [Lam] + \frac{K_{M,Lam}}{K_{I,Glc}}[Glc]\right) \cdot (K_{M,G1P} + [G1P])} \quad (25)$$

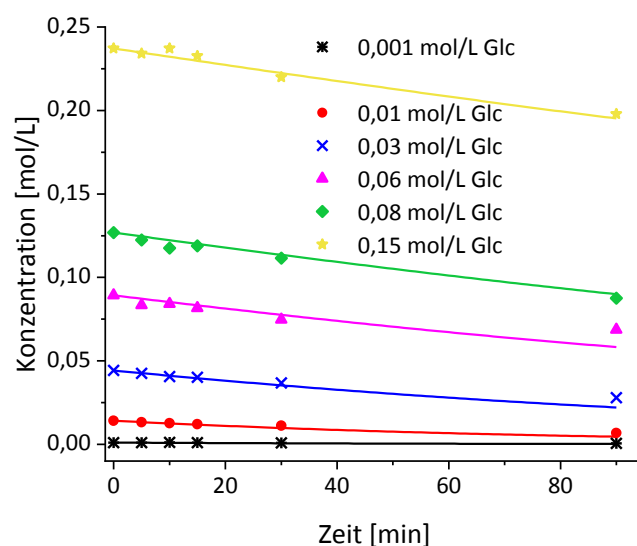
$$\frac{d[Lam3]}{dt} = \frac{v_{\max,Lam3}[Lam][G1P]}{\left(K_{M,Lam} + [Lam] + \frac{K_{M,Lam}}{K_{I,Glc}}[Glc]\right) \cdot (K_{M,G1P} + [G1P])} \quad (26)$$

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von LP muss Phosphat als Produkt nicht im Modell erfasst werden. Da Phosphat im Fall von SP allerdings Substrat ist, muss es im bienzymatischen System, mit der folgenden Gleichung, berücksichtigt werden.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{I,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{I,G1P}K_{M,Glc}}{K_{I,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{I,1}}[Glc]^2} + \frac{v_{\max,Lam3}[Lam][G1P]}{\left(K_{M,Lam} + [Lam] + \frac{K_{M,Lam}}{K_{I,Glc}}[Glc]\right) \cdot (K_{M,G1P} + [G1P])} \quad (27)$$

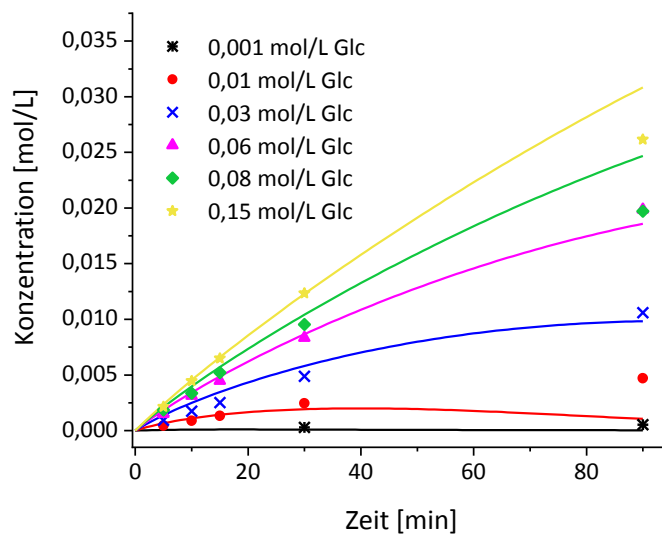
Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die experimentell, bei unterschiedlichen Substratkonzentrationskombinationen, ermittelten Glucose-1-phosphat-, Glucose-, Laminaribiose- und Laminaritriosekonzentrationen mit ModelMaker 3 an die Gleichungen gefittet.





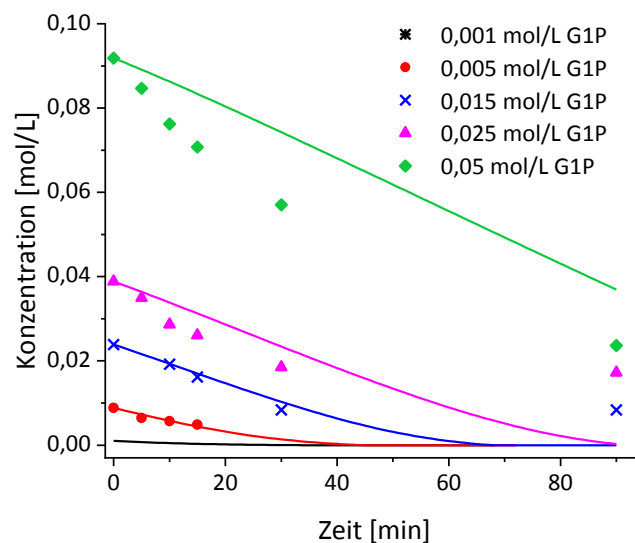
**Abbildung 24** Zeitverlauf der Umsetzung von Glucose mit LP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g LP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Glucose-1-phosphatsubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,06 mol/L. Die Glucosesubstratkonzentrationen wurden variiert.

Abbildung 24 zeigt die sehr gute Übereinstimmung des Modells mit den experimentell ermittelten Glucosekonzentrationen bei Variation der Glucosesubstratkonzentrationen und konstanter Glucose-1-phosphatkonzentration. Abbildung 25 zeigt die Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Laminaribiosekonzentrationen. Das Modell zeigt bis 30 min eine sehr gute Übereinstimmung mit den gemessenen Konzentrationen. Die spätere Laminaribiosebildung kann weniger gut abgebildet werden. Dies deutet auf eine schlechtere Abbildung der Bildung höherer Oligosaccharide durch das Modell hin. Dabei wird die Produktbildung bei mittleren Glucosekonzentrationen (0,03 und 0,06 M) besser als bei sehr niedrigen oder sehr hohen Glucosekonzentrationen beschrieben. Die Triosebildung im Modell liegt weit über der gemessenen Laminaritriosekonzentration. Dies ergibt sich durch eine Zusammenfassung der Gesamtoligosaccharidbildung im Modell als Triosebildung, wobei nur Laminaritriose auch analytisch sicher erfasst und als Messwert genutzt wurde.



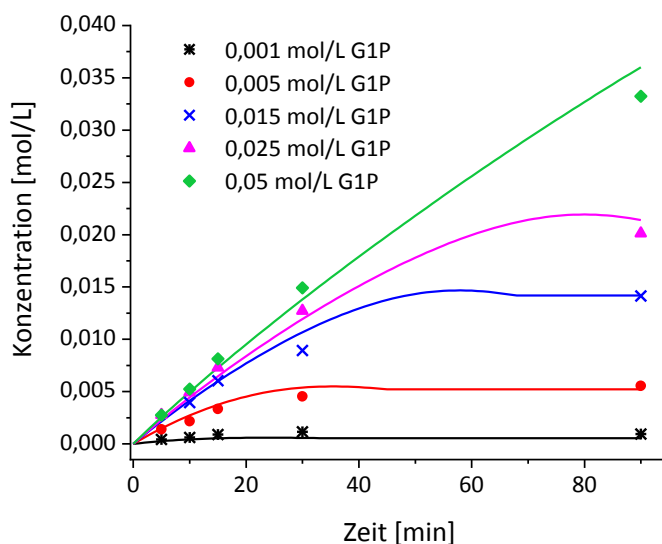
**Abbildung 25** Zeitverlauf der Bildung von Laminaribiose mit LP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g LP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Glucose-1-phosphatsubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,06 mol/L. Die Glucosesubstratkonzentrationen wurden variiert.

Abbildung 26 und Abbildung 27 zeigen experimentell ermittelte Glucose-1-phosphat- bzw. Laminaribiosekonzentrationen mit den modellierten Konzentrationsverläufen. In Abbildung 26 wird deutlich, dass das Modell die Konzentrationsverläufe mit zunehmender Startkonzentration schlechter abbilden kann, wobei bis auf 0,05 mol/L G1P der G1P-Verbrauch tendenziell überschätzt wird. Auch hier zeigt sich eine bessere Übereinstimmung bis 30 min als für spätere Messwerte. Die Abweichungen werden auch hier sicher durch die nicht im Gleichungssystem berücksichtigte G1P verbrauchende Bildung höherer Laminarioligosaccharide verursacht.



**Abbildung 26** Zeitverlauf der Umsetzung von Glucose-1-Phosphat mit LP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g LP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Glucosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,3 mol/L. Die Glucose-1-phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Da die kinetischen Daten der SP-Sepabeads gezeigt haben, dass mit hohen G1P-Konzentrationen im bienzymatischen System nicht zu rechnen ist, und die Produktbildung (Abbildung 27) gut abgebildet wird, kann dies akzeptiert werden.



**Abbildung 27** Zeitverlauf der Bildung von Laminaribiose mit LP-Sepabeads. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,05 g LP-Sepabeads in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Glucosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,3 mol/L. Die Glucose-1-phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Die ermittelten kinetischen Parameter in Tabelle 33 zeigen ebenfalls die bewusste Überschätzung der Triosebildung durch einen niedrigen  $K_M$ -Wert von Laminaribiose und eine im Vergleich zur Laminaribiosebildung hohe Laminaritriosebildungsgeschwindigkeit. Die Bildungsgeschwindigkeit von Laminaribiose ist dennoch höher als die Bildungsgeschwindigkeit von höheren Oligosacchariden. Die höchste Affinität zeigt das Enzym zu G1P, das es zuerst bindet. Laminaribiose wird mit höherer Affinität gebunden als Glucose. Die Triosebildung wird bereits bei mittleren Glucosekonzentrationen ( $K_{i,Glc}$  0,05 mol/L), die in einem bienzymatischen System sehr schnell durch Saccharosehydrolyse und Zugabe von Glucose als Substrat vorliegen, inhibiert.

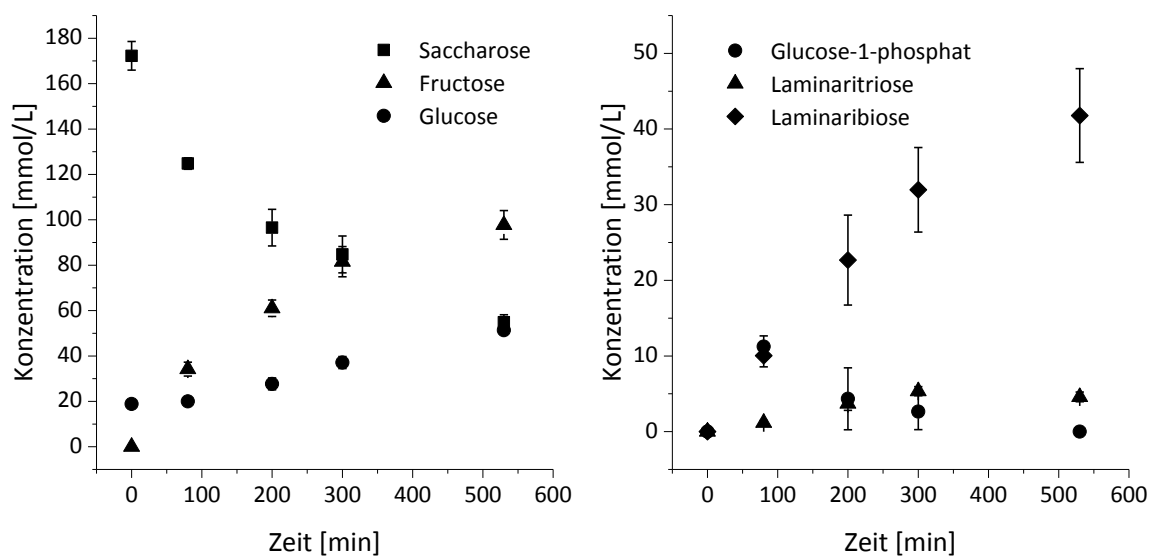
**Tabelle 33** Kinetische Parameter von LP auf Sepabeads.

$K_{i,1}$ [mol/L]	$K_{i,G1P}$ [mol/L]	$K_{i,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,G1P}$ [mol/L]	$K_{M,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,Lam}$ [mol/L]	$v_{max,Lam}$ [mol/(g·min)]	$v_{max,Lam3}$ [mol/(g·min)]
1,159	0,357	0,048	2,771E-07	7,091E-03	1,286E-03	2,324E-05	7,663E-06

Die kinetischen Parameter der Laminaribiosephosphorylase konnten insgesamt weniger genau bestimmt werden als die kinetischen Parameter der Sucrosephosphorylase. Da es sich bei dem hier als Laminaribiosephosphorylase bezeichneten Rohextrakt tatsächlich um mindestens zwei Enzyme handelt, deren Reaktionen sich überlagern und für die im Falle von Laminaribiosephosphorylase zusätzlich 3 Isoformen bekannt sind, bei denen zwei eine abweichende Spezifität zu Laminariooligosacchariden zeigen [203], ist dies nicht verwunderlich. Da das Ziel der Arbeit nicht eine abschließende Beschreibung der kinetischen Aktivität des Rohextraktes war, wurde die vorliegende Kinetik als für das Projekt ausreichend betrachtet und zur Simulation von Bedingungen für ein bienzymatisches System genutzt.

#### 5.2.3.4 Versuch der bienzymatischer Produktion von Laminaribiose mit Glucose als Cosubstrat und Entwicklung eines bienzymatischen Modells

Zum Test auf Durchführbarkeit einer bienzymatischen Produktion von Laminaribiose wurde auf Grundlage der ursprünglich von Waluga [15] erstellten Matlab®-Programme Bedingungen für ein bienzymatisches System ausgewählt, unter denen neben Laminaribiose- auch Laminaritriosebildung beobachtbar ist. Als Substrate wurde 200 mmol/L Saccharose und 16 mmol/L Glucose eingesetzt. Abbildung 28 zeigt, dass die bienzymatische Produktion grundsätzlich erfolgreich ist. Dabei findet in den ersten 80 min die stärkste Umsetzung von Saccharose statt. Anschließend nimmt die Konzentration linear bis ca. 55 mmol/L Saccharose am Ende des Experiments ab. Die Saccharoseumsetzung wird von der Bildung von Fructose begleitet. Die Glucosekonzentration nimmt ebenfalls zu und erreicht nach 530 min 47 mmol/L. Die Laminaribiosekonzentration nimmt in den ersten 300 min linear zu. Anschließend verlangsamt sich die Zunahme und die Konzentration erreicht schließlich nach 530 min 42 mmol/L, entsprechend einer Ausbeute von 20 %. In den ersten 300 min kommt es zur Bildung von Laminaritriose, wobei die Konzentration anschließend wieder absinkt. Der Grund dafür ist vermutlich die Bildung höherer Oligosaccharide.



**Abbildung 28** Konzentrationsverläufe von Saccharose, Glucose, Fructose (links), Glucose-1-phosphat, Laminaribiose und Laminaritriose (rechts) bei der bienzymatischen Produktion von Laminaribiose mit 200 mmol/L Saccharose und 16 mmol/L Glucose als Startkonzentrationen (N = 3). 0,035 g SP-Sepabeads (0,8 U) und 0,1 g LP-Sepabeads (0,9 U) wurden in 1,8 mL Reaktionsvolumen zur Produktion eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37 °C durchgeführt. Die Substrate wurden in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) gelöst.

Im trienzymatischen System konnte bei der Produktion von Laminaribiose nur eine Ausbeute von 13,3 % erreicht werden. Damit ist die Ausbeute im bienzymatischen System ca. 7 Prozentpunkte höher. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen sind die Ausbeuten allerdings schwer miteinander vergleichbar. Die bienzymatischen Versuche zeigen allerdings nochmals, dass es auch in einem bienzymatischen System mit LP-Überschuss zu ausgeprägter Glucosebildung kommt. Ohne den Einsatz von GI kann zudem sichergestellt werden, dass es nicht zu einer Isomerisierung der Glucose zu Fructose kommt. Die Umsetzung eines trienzymatischen Systems ist nur dann sinnvoll, wenn eine SP verwendet wird, die eine geringere Saccharosehydrolyse aufweist, und eine GI genutzt wird, deren Optimumsbedingungen, insbesondere die Temperatur, besser mit denen der anderen Enzyme zusammenpasst.

Die experimentell ermittelten Daten des Versuchs wurden dazu genutzt, mit ModelMaker 3® auf Grundlage der monoenzymatischen Kinetiken und Halbwertszeiten der SP- und LP-Sepabeads ein Modell des bienzymatischen Systems zu erstellen. Das Modell wurde wiederum genutzt, um Bedingungen für weitere bienzymatische Reaktionen auszuwählen. Mit den Ergebnissen weiterer Experimente wurden auch die Parameter des Modells weiter optimiert. Abbildung 29 zeigt die Übereinstimmung des optimierten Modells mit der in Abbildung 28 vorgestellten bienzymatischen Reaktion. Dabei zeigt sich, dass das bienzymatische Modell außer für Glucose die Konzentrationsverläufe gut beschreiben kann. Die gemessenen Startkonzentrationen von Saccharose und Glucose liegen allerdings, wie auch bereits bei den kinetischen Versuchen, unterhalb der tatsächlichen Substratkonzentrationen, die vor Zugabe zu Sepabeads gemessen wurden. Dies ist auf die Aufnahme der Zucker durch Sepabeads zurückzuführen. So zeigte sich in Vorversuchen mit unbeladenen Sepabeads, dass 0,135 g Sepabeads bis zu 0,02 mol/L Glucose (Startkonzentration 0,4 mol/L) bzw. 0,01 mol/L Saccharose (Starkonzentration 0,1 mol/L) adsorbieren können (persönliche Kommunikation Dave Hartig).

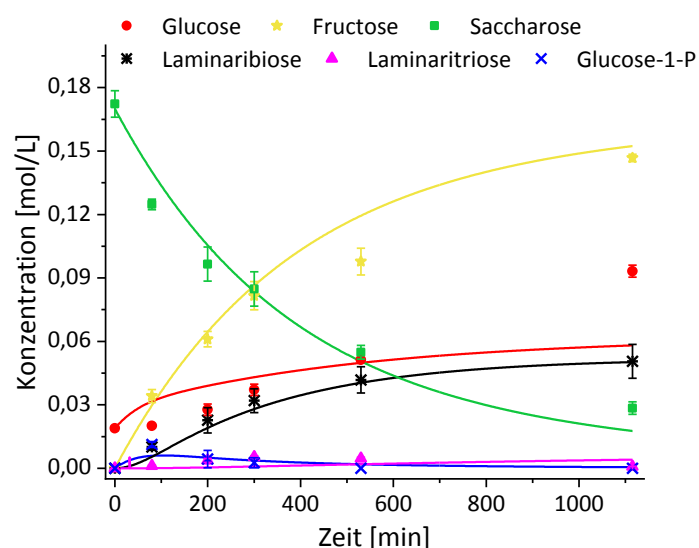


Abbildung 29 Gemessene Konzentrationen und modellierte Verläufe von Saccharose, Glucose, Fructose, Glucose-1-phosphat, Laminaribiose und Laminaritriose bei der bienzymatischen Produktion von Laminaribiose mit 200 mmol/L Saccharose und 16 mmol/L Glucose als Startkonzentrationen (N = 3). 0,035 g SP-Sepabeads (0,8 U) und 0,1 g LP-Sepabeads (0,9 U) wurden in 1,8 mL Reaktionsvolumen zur Produktion eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37 °C durchgeführt. Die Substrate wurden in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) gelöst.

In Tabelle 34 sind die ermittelten kinetischen Parameter des bienzymatischen Systems aufgeführt.

Tabelle 34 Kinetische Parameter von LP und SP auf Sepabeads im bienzymatischen System.

Parameter SP							
K <sub>M,Sac</sub> [mol/L]		K <sub>M,P</sub> [mol/L]		v <sub>max,S-Phos</sub> [mol/(g·min)]		v <sub>max,S-Hyd</sub> [mol/(g·min)]	
0,512		7,761E-19		3,271E-05		5,195E-05	
Parameter LP							
K <sub>I,1</sub> [mol/L]	K <sub>I,G1P</sub> [mol/L]	K <sub>I,Glc</sub> [mol/L]	K <sub>M,G1P</sub> [mol/L]	K <sub>M,Glc</sub> [mol/L]	K <sub>M,Lam</sub> [mol/L]	v <sub>max,Lam</sub> [mol/(g·min)]	v <sub>max,Lam3</sub> [mol/(g·min)]
0,300	2,460	1,778E-05	2,771E-07	7,066E-05	3,540E-03	7,399E-05	8,322E-07

Die kinetischen Parameter unterscheiden sich zum Teil erheblich von den für monoenzymatische Experimente ermittelten Parametern. Dabei ist auffällig, dass sich die  $v_{\max}$ -Werte für SP und LP im bienzymatischen System deutlich verringern. Dies ist möglicherweise auf den Einfluss der Diffusion der Intermediate zwischen SP und LP zurückzuführen. Das Ergebnis der monoenzymatischen SP-Kinetik, dass es sich bezogen auf Phosphat um eine Reaktion nullter Ordnung handelt, wird hier nochmals durch einen gegen Null gehenden  $K_M$ -Wert bestätigt.

Trotz der Abweichungen bei Glucose beschreibt das Modell das Verhalten des bienzymatischen Systems insgesamt gut, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesen Abweichungen um eine zusätzliche Reaktion handelt wie einen Zerfall höherer Oligosaccharide unter Abspaltung von Glucose.

## 5.3 Verbesserung der Stabilität von Sepabead immobilisierten Enzymen

Eine Strategie zur Verbesserung der (operativen) Stabilität und Wiederverwendbarkeit von Enzymen ist der Einschluss bereits immobilisierter Enzyme in Biopolymeren. Zur Herstellung eines Zuckers, dessen Anwendungsgebiete in der Lebensmittel- und/oder pharmazeutischen Industrie liegen, ist es sinnvoll, Biopolymere zum Einschluss der Katalysatoren einzusetzen, die für den Einsatz in diesen Industriebereichen zugelassen sind. Weitere Kriterien sind eine einfache und kostengünstige Einschlussmethode, bei der Aktivitätsverluste so gering wie möglich sind.

### 5.3.1 Screening von Biopolymeren

Zu den Biopolymeren mit einfach umsetzbaren Gelierungsmechanismen und Zulassung in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie gehören Chitosan, Agar/Agarose und Alginat.

Im Fall von in Essigsäure gelöstem Chitosan kann die Gelierung durch Eintropfen in eine Polyphosphatlösung ausgelöst werden, bei Alginat erfolgt sie durch Eintropfen in Calciumchlorid. Zur Gelierung von gelöstem Agar/Agarose ist nur eine Verringerung der Temperatur notwendig. Im Zuge des Projektes „Integration von Reaktion und Produktabtrennung für trienzymatisch katalysierte Synthesen hochwertiger Oligosaccharide aus Saccharose“ des Instituts für Chemische und Thermische Verfahrenstechnik und des Instituts für Technische Chemie wurden diese Biopolymere für den Einschluss von Sepabead-immobilisierten Enzymen getestet. In dieser Arbeit wurde der Einschluss in Agar bzw. Agarose untersucht. Tabelle 35 fasst die im Rahmen des Projektes untersuchten Polymere bzw. Einschlussmethoden zusammen.

**Tabelle 35 Übersicht über die getesteten Biopolymere zum Einschluss von Sepabeads mit dem Bereich der getesteten Konzentrationen, der Herstellung der Polymerlösungen und Polymerisierungsmitteln/-methoden.**

Biopolymer	gelöst in	Polymerisierungsmethode
2,5-3,5 % Alginsäure	H <sub>2</sub> O	0,1-0,3 M CaCl <sub>2</sub>
1,5-2,5 % Chitosan	1,5% Essigsäure (pH 2,5) 1,5 % Essigsäure (pH 4,75) – pH mit NaOH eingestellt	10 % Natriumpolyphosphat
3-4 % Agar	H <sub>2</sub> O / 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)	Temperatur
3-5 % low- melt Agarose	H <sub>2</sub> O / 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)	Temperatur

Für das Screening wurden zunächst nur Sepabeads ohne Enzym in Polymer eingeschlossen. Die Stabilität der hergestellten Perlen, bzw. Würfel im Fall von Agar und Agarose, wurde über Rühren oder Schütteln in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bestimmt. Kam es über Nacht nicht zur Freisetzung großer Mengen Sepabeads, wurden anschließend aktive LP-Sepabeads in den Polymeren eingeschlossen. Die Lanzeitstabilität der Produktbildung wurde bestimmt und mit der von LP-Sepabeads verglichen. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 36 zusammengefasst. Die Ergebnisse zu Chitosan und Alginat wurden den Arbeiten von Sass [237] und Meyer [238] entnommen.

**Tabelle 36 Vergleich der Größe, Stabilität und Aktivitäten von LP-Sepabeads, die in verschiedenen Biopolymeren eingeschlossen wurden. Die Aktivität von 0,05 g LP Sepabeads in 1 mL Polymer wurde in 2 mL 0,05 mol/L Glucose und 0,03 mol/L Glucose-1-phosphat gelöst in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) bei 37 °C bestimmt. Nach [223].**

Träger + Polymer	Größe [mm]	Stabilität in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)	Aktivität nach 96 h [g/(L·h)]
Sepabeads	0,1 - 0,3	+	0,24
Sepabeads + Alginat	1,5 - 3	-	nicht bestimmt
Sepabeads + Agar	4	+	keine messbare Aktivität
Sepabeads + low-melt Agarose	4	+	keine messbare Aktivität
Sepabeads + Chitosan (pH 2,5)	1,5 - 3	+	0,11
Sepabeads + Chitosan (pH 4,75)	1,5 - 3	+	0,52

In allen Polymeren konnten Sepabeads eingeschlossen werden. Beim Einschluss in Alginat kommt es allerdings beim Kontakt mit Phosphatpuffer zur Bildung und Ausfällung von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Da  $\text{Ca}^{2+}$  zur Bildung stabiler Alginatperlen nötig ist und Phosphat im bienzymatischen System Substrat bzw. Intermediat ist, wurde der Einschluss in Alginat nicht weiter untersucht. Beim Einschluss von LP-Sepabeads in 4 % Agar kam es zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Der Einschluss bei niedrigeren Temperaturen in low-melt-Agarose führte ebenfalls zur vollständigen Inaktivierung.

Um eine Inaktivierung des Enzyms durch zu niedrige pH-Werte auszuschließen bzw. zu überprüfen, ob es zur Inaktivierung durch niedrige pH-Werte kommt, wurde der Einschluss von LP-Sepabeads in Chitosanlösung mit pH 2,5 und einer Chitosanlösung mit pH 4,75 untersucht. Tabelle 36 zeigt, dass eine Immobilisierung bei beiden pH-Werten möglich ist. LP-Sepabeads, die bei pH 4,75 eingeschlossen wurden, weisen nach 96 h eine höhere Aktivität auf als nicht eingeschlossene LP-Sepabeads. LP-Sepabeads, die bei pH 2,5 eingeschlossen wurden, sind dagegen weniger aktiv. Als Konsequenz wurde der Einschluss von auf Sepabeads immobilisierten Enzymen in Chitosan genauer untersucht.

No [239] konnte zeigen, dass Chitosan antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien aufweist. Damit hat die Verwendung von Chitosan als Einschlussmedium den zusätzlichen Vorteil, dass es die Gefahr mikrobieller Kontaminationen während eines Produktionsprozesses verringert. Zusätzlich kann der Einschluss in Chitosan die Thermostabilität von Enzymen erhöhen [96]. Bei multienzymatischen Reaktionen mit Enzymen mit unterschiedlichen Thermostabilitäten und temperaturabhängiger Produktivität ist das besonders interessant.

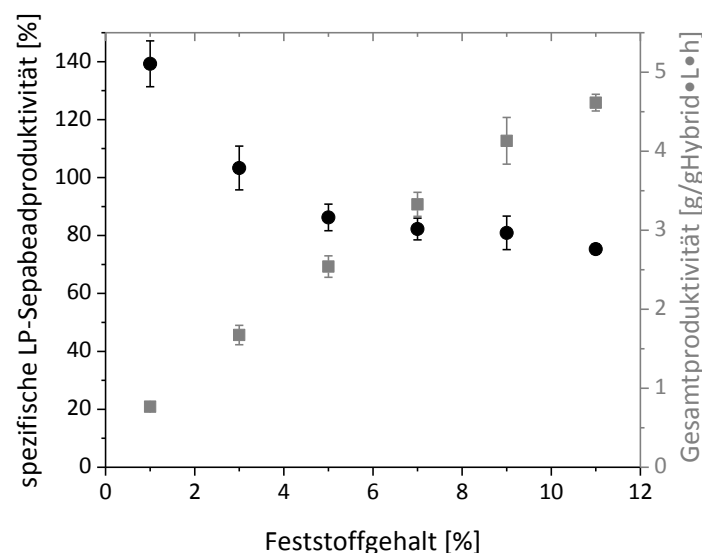
### 5.3.2 Optimierung der Immobilisierung

Im Screening der Biopolymere wurde bereits festgestellt, dass der pH-Wert ein entscheidender Faktor beim Erhalt der Enzymaktivität während des Einschlusses ist. Neben dem pH-Wert der Essigsäurelösung stellt auch der pH-Wert der Polyphosphatlösung eine mögliche Inaktivierungsquelle dar. Eine weitere Herausforderung beim Einschluss in Chitosan ist die Möglichkeit eines reduzierten

Massentransports von Reaktanten und Produkten von und zum Enzym, da auf diese Weise die Gesamtkinetik des Enzyms verringert wird [240]. Da die Porengröße im Gel unter anderem von der Chitosankonzentration beeinflusst wird, wurde die Herstellung von Chitosanperlen im Rahmen des Projektes am Institut für Chemische und Thermische Verfahrenstechnik untersucht und optimiert. Dabei wurde versucht, einen Kompromiss zwischen größtmöglicher Stabilität der Perlen, größtmöglicher Aktivität der Enzyme und höchster Diffusivität zu finden. Um dies zu erreichen, wurde versucht, die Chitosan- und Polyphosphatkonzentrationen so niedrig wie möglich und die pH-Werte so neutral wie möglich zu halten. Das Ergebnis war ein Verfahren, bei dem Sepabeads zu einer 1,5 %-igen Chitosanlösung in 1,5 % Essigsäure gegeben wurden, deren pH-Wert zuvor mit NaOH auf 4,75 angehoben wurde. Die anschließende Quervernetzung erfolgte in eisgekühlter 10 %-iger Polyphosphatlösung (pH 6,5).

Beim Einschluss von 0,05 g LP-Sepabeads in 1 mL Chitosanlösung konnte  $86 \pm 5$  % Aktivität der LP-Sepabeads erhalten werden [237], beim Einschluss von 0,025 g SP-Sepabeads  $89 \pm 5$  %. Die verbesserte Langzeitstabilität und Aktivität von SP-Sepabeads in Chitosan wurde von Meyer [238] untersucht und bestätigt. Die entstandenen Immobilsate werden hier als Hybridimmobilsate bezeichnet.

Ergebnisse von Dave Hartig (persönliche Kommunikation) deuten darauf hin, dass der Diffusionskoeffizient von Fructose bei geringen Konzentrationen in 2 %-igen Chitosanmembranen nahe dem der freien Diffusion liegt. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Reduzierung der Aktivität durch die eingeschlossenen Feststoffe selber verursacht wird. Da alle anderen Einflussfaktoren, wie die Chitosankonzentration, bereits so weit wie möglich minimiert wurden, war sie außerdem der einzige noch verbliebene Faktor zur Optimierung. Um den Einfluss des Feststoffgehaltes auf die Aktivität bzw. Produktivität der Hybridimmobilsate zu untersuchen, wurde der Feststoffgehalt zwischen 1 und 11 % variiert.



**Abbildung 30** Spezifische Produktivität der LP-Sepabeads in Hybridimmobilsaten (schwarz) und Gesamtproduktivität der Hybridimmobilsate (grau) mit unterschiedlichem Sepabeadgehalt (N = 3). Die Laminaribioseproduktion der Immobilsate wurde bei 35 °C und mit 2 mL Substat [0,05 mol/L Glu und 0,05 mol/L G1P gelöst in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)] bestimmt. Nach [223].



Abbildung 30 zeigt, dass die Gesamtproduktivität der Hybridimmobilisate mit steigendem Feststoffgehalt zunimmt. Bis zu einem Feststoffgehalt von 5 % ist dieser Anstieg proportional zur Menge der eingeschlossenen LP-Sepabeads. Wird der Feststoffgehalt weiter erhöht, kann die Erhöhung der Enzymkonzentration nicht mehr vollständig in erhöhte Laminaribioseproduktion der Hybridimmobilisate übersetzt werden. Bei niedrigen Feststoffgehalten (< 3 %) ist die spezifische Produktivität der LP-Sepabeads in Chitosan höher als die von LP-Sepabeads in Puffer. Die Laminaribioseproduktion der eingeschlossenen LP-Sepabeads verringert sich mit zunehmendem Feststoffgehalt. Bis zu einem Feststoffgehalt von 5 % ist die Abnahme proportional zur Menge an eingeschlossenen Sepabeads. Danach stabilisiert sich die erhaltene Produktivität. Zwei mögliche Erklärungen für diesen Effekt sind die Oligosaccharidbildung und eine Verstärkung von Diffusionsbarrieren durch den erhöhten Feststoffgehalt.

Somit führt eine Erhöhung des Sepabeadanteils in den Hybridimmobilisaten zu einer vergrößerten Gesamtproduktivität der Hybridimmobilisate und damit zu einer verbesserten Raum-Zeit-Ausbeute. Wenn auch die spezifische Produktivität der LP-Sepabeads mit zunehmender Sepabeadbeladung abnimmt, ist der Verlust an Produktivität selbst bei sehr hohem Feststoffgehalt (11 %) mit 75 % Restproduktivität sehr gering. Dies ist auch im Vergleich mit anderen Methoden zum Einschluss von Immobilisaten, wie dem Einschluss von CLEAs in Lenticats durch Wilson et al. [109] (60 % Restaktivität), geringer.

Bei der Wahl des geeigneten Feststoffgehaltes sollte die Stabilität der Immobilisate nicht außer Acht gelassen werden. In den Experimenten wurde festgestellt, dass die mechanische Stabilität der Immobilisate mit einem Feststoffgehalt größer als 3 % verringert ist, was insbesondere bei längeren Produktionszeiten problematisch ist. Da das Ziel des Projektes die Entwicklung eines kontinuierlichen Produktionsverfahrens war, wurde ein Feststoffgehalt von 3 % für weitere Versuche ausgewählt. Die Veränderung des Feststoffgehalts stellt trotzdem eine sehr einfache Möglichkeit dar, um in multi-enzymatischen Systemen die Raum-Zeit-Ausbeute anzupassen.

### **5.3.3 Charakterisierung der Immobilisate**

Ein Einschluss in Chitosan kann die Thermostabilität von Enzymen verbessern [96]. Im folgenden Kapitel sollen die neu entwickelten Hybridimmobilisate hinsichtlich ihrer Temperatur, pH-Wert und Puffermolaritätspräferenzen charakterisiert werden, um geeignete Bedingungen für ein bienzymatisches System festlegen zu können. Bei der Charakterisierung wurde wiederum auf die *Response surface Methodology* und ein *Central Composite Design (Face-Centered)* zurückgegriffen. Da wie zuvor für das trienzymatische System die Bedingungen vor allem auf das Schlüsselenzym Laminaribiosephosphorylase angepasst werden sollten und nur eine begrenzte Menge SP zur Verfügung stand, wurden nur LP-Hybridimmobilisate ausführlicher charakterisiert.

#### **5.3.3.1 Charakterisierung von Laminaribiosephosphorylase mit statistischer Versuchsplanung**

Bei der Festlegung der zu untersuchenden Bereiche war bei Charakterisierung der Sepabeads noch die Entwicklung eines trienzymatischen Systems das Ziel. Aufgrund dessen wurde 37 °C als Minimaltemperatur festgelegt. Ein Ergebnis war, dass nicht die Optimaltemperatur der LP-Sepabeads bestimmt werden konnte, sondern nur die Optimaltemperatur in dem vorgegebenen Temperaturbereich. Die Hybridimmobilisate sollten dagegen im bienzymatischen System zur Produktion von Laminaribiose eingesetzt werden. Daher wurde der Temperaturbereich nach unten auf

25 °C erweitert und nach oben auf 45 °C begrenzt. Die Stabilität bzw. Aktivität der Immobilisate wurde über sieben Tage bestimmt, um passende Bedingungen für lange Prozesszeiten bzw. eine kontinuierliche Produktion finden zu können. Tabelle 37 fasst die Versuchsbedingungen und Ergebnisse zusammen. Als Antwortvariablen wurde neben der Laminaribioseproduktion die Laminaritrioseproduktion definiert.

**Tabelle 37 Versuchsbedingungen und -ergebnisse des *Central Composite Designs (face-centered)*, zur Bestimmung der pH-Wert-, Molaritäts- und Temperatureinflüsse auf die Laminaribioseproduktion über 7 Tage.** 0,3 g LP-Hybridimmobilisate wurden unter diesen Bedingungen über 7 Tage inkubiert. Die Aktivität wurde mit 2 mL Substrat (0,05 mol/L G1P und Glc) an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 bestimmt. Die Laminaribioseproduktion nach 1 h an Tag 1 (Y<sub>1</sub>), Tag 4 (Y<sub>2</sub>) und Tag 7 (Y<sub>3</sub>) und die Laminaritrioseproduktion nach 1 h an Tag 1 (Y<sub>4</sub>), Tag 4 (Y<sub>5</sub>) und Tag 7 (Y<sub>6</sub>) wurden als Antwortvariablen genutzt. Nach [223].

Run	A pH [-]	B Temperatur [°C]	C Molarität [M]	Systemantwort [μmol/g]					
				Y <sub>1</sub> Tag 1 Lam	Y <sub>2</sub> Tag 4 Lam	Y <sub>3</sub> Tag 7 Lam	Y <sub>4</sub> Tag 1 Lam3	Y <sub>5</sub> Tag 4 Lam3	Y <sub>6</sub> Tag 7 Lam3
1	6	25	0,01	5,31	6,66	6,53	0,07	0,45	0,42
2	7,5	25	0,01	5,35	6,59	6,54	0,07	0,51	0,52
3	6	45	0,01	13,09	2,28	1,97	0,18	0,00	0,00
4	7,5	45	0,01	13,46	2,69	0,78	0,22	0,10	0,00
5	6	25	0,1	3,69	4,63	3,47	0,04	0,10	0,00
6	7,5	25	0,1	3,40	3,66	3,51	0,03	0,17	0,15
7	6	45	0,1	9,43	2,35	1,05	0,10	0,00	0,00
8	7,5	45	0,1	8,11	1,34	0,25	0,09	0,00	0,00
9	6	35	0,055	7,81	8,30	6,04	0,09	0,15	0,10
10	7,5	35	0,055	8,45	7,66	5,28	0,13	0,26	0,16
11	6,75	25	0,055	5,01	5,79	5,92	0,07	0,31	0,33
12	6,75	45	0,055	12,97	2,90	1,47	0,21	0,00	0,00
13	6,75	35	0,01	10,88	10,49	8,32	0,22	0,37	0,32
14	6,75	35	0,1	7,33	7,61	5,31	0,13	0,22	0,14
15	6,75	35	0,055	8,29	8,11	6,19	0,15	0,29	0,21
16	6,75	35	0,055	8,67	9,10	6,15	0,14	0,28	0,19
17	6,75	35	0,055	8,62	9,14	7,17	0,13	0,25	0,26

Die ermittelten Daten wurden mithilfe von Design Expert an ein polynomisches Modell zweiter Ordnung gefittet. Die Modelle wurden mit Varianzanalyse (ANOVA) untersucht und um Modellterme reduziert, wenn es zu einer Verbesserung des Modells führte. Es ergaben sich die folgenden Gleichungen:

$$Y_1 = 8,82 - 0,06 A + 3,43 B - 1,61 C - 0,09 AB - 0,25 BC - 1,01 A^2 \quad (28)$$

$$Y_2 = 8,79 - 0,23 A - 1,58 B - 0,91 C - 0,05 AB - 0,29 AC + 0,46 BC - 0,82 A^2 - 4,45 B^2 + 0,25 C^2 \quad (29)$$

$$Y_3 = 6,54 - 0,27 A - 2,04 B - 1,05 C - 0,25 AB + 0,05 AC + 0,58 BC - 0,90 A^2 - 2,87 B^2 + 0,25 C^2 \quad (30)$$

$$Y_4 = 0,15 - 5,26E-03 A + 0,05 B - 0,04 C - 0,02 BC - 0,05 A^2 \quad (31)$$

$$Y_5 = 0,26 - 0,03 A - 0,15 B - 0,09 C - 0,01 AC - 0,07 BC - 0,05 A^2 - 0,10 B^2 + 0,04 C^2 \quad (32)$$

$$Y_6 = 0,21 + 0,03 A - 0,14 B - 0,10 C - 0,03 AB + 0,10 BC - 0,07 A^2 - 0,03 B^2 + 0,03 C^2 \quad (33)$$

Die vollständigen Ergebnisse der Varianzanalysen befinden sich im Anhang (Kapitel 9.3). Alle Modelle haben einen F-Wert, der ihre Signifikanz bestätigt. Die Bestimmtheitsmaße der Modelle ( $Y_1$  0,986,  $Y_2$  0,989,  $Y_3$  0,987,  $Y_5$  0,987 und  $Y_6$  0,988) zeigen, dass die Modelle über 98 % der gesamten Variation erklären können. Das Bestimmtheitsmaß des Modells  $Y_4$  ist  $R^2$  0,921 und kann damit nur 92 % der Variation erklären. Bei den Laminaribiosemodellen ( $Y_1$ - $Y_3$ ) sind die p-Werte von A (pH-Wert) größer als 0,05. Das bedeutet, dass der Term statistisch nicht signifikant ist. Der quadratische Term ( $A^2$ ) ist dagegen signifikant. Insgesamt zeigt sich, dass der pH-Wert im Vergleich zur Molarität und der Temperatur, die in allen Modellen signifikant sind, einen geringen Einfluss auf die Laminaribiosebildung der LP-Hybridimmobilisate hat. Dieses Phänomen ist deshalb besonders interessant, weil der pH-Wert bei LP-Sepabeads den größten Einfluss auf die Laminaribiosebildung hat. Es deutet darauf hin, dass Chitosan eine Mikroumgebung erzeugt, in der der pH-Wert der Umgebung eine geringere Rolle spielt. Für die Laminaritriosebildung ist der p-Wert nur in Modell  $Y_4$  größer als 0,05 (0,052). Die p-Werte der Modelle  $Y_5$  (0,049) und  $Y_6$  (0,005) zeigen, dass die Bedeutung des pH-Wertes im Falle von Laminaritriose mit der Dauer der Inkubation zunimmt.

Die Bildung von Laminaribiose findet bei niedrigen Molaritäten bevorzugt statt (Abbildung 31). Da LP die Hin- und Rückreaktion katalysiert, also bei hohen Molaritäten vermutlich Laminaribiose phosphoryliert, ist dies nicht überraschend. Einen noch größeren Einfluss auf die Laminaribioseproduktion/Stabilität des Enzyms als die Molarität hat jedoch die Temperatur. Abbildung 31 zeigt, dass die meiste Laminaribiose an Tag 1 bei hohen Temperaturen (45 °C) gebildet wird. An Tag 4 und 7 verschiebt sich das Produktionsoptimum zu mittleren bis niedrigen Temperaturen. Eine ähnliche Temperaturverschiebung wurde bereits bei der Charakterisierung der LP-Sepabeads beobachtet. Die Bildung von Laminaritriose findet vergleichbar mit der Bildung von Laminaribiose bei niedrigen Molaritäten statt (Abbildung 32). Dagegen findet die Verschiebung von hohen zu niedrigen Temperaturen früher und stärker ausgeprägt statt. Bereits von Tag 1 auf Tag 4 verschiebt sich das Temperaturoptimum für Laminaritriosebildung von 45 auf 25 °C. Die Optimaltemperatur der Laminaribiosebildung liegt am vierten Tag dagegen eher bei 30-35 °C.

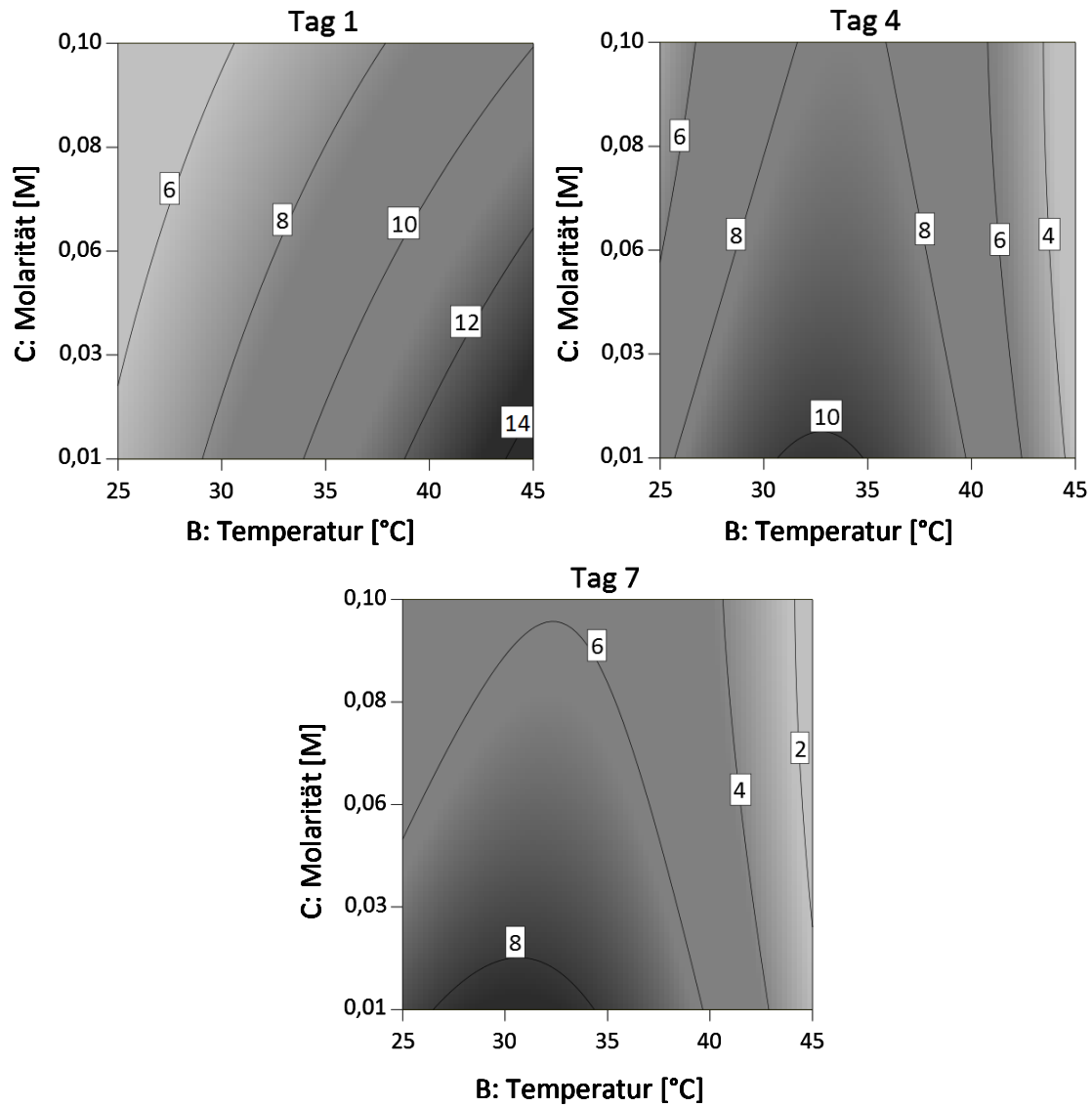


Abbildung 31 Konturplots bei pH 6,75 der Antwortvariablen  $Y_1$  Laminaribioseproduktion an Tag 1,  $Y_2$  Laminaribioseproduktion an Tag 4,  $Y_3$  Laminaribioseproduktion an Tag 7. Die Konturplots verdeutlichen den Einfluss der Molarität und der Temperatur auf die Laminaribioseproduktion über eine Woche. Die Einheit der gegebenen Werte ist  $\mu\text{mol/g}$ . Die Produktion von Laminaribiose wurde mit 0,3 g LP-Hybridimmobilisaten mit 2 mL Substrat (0,05 mol/L G1P und Glu) getestet. Nach [223].

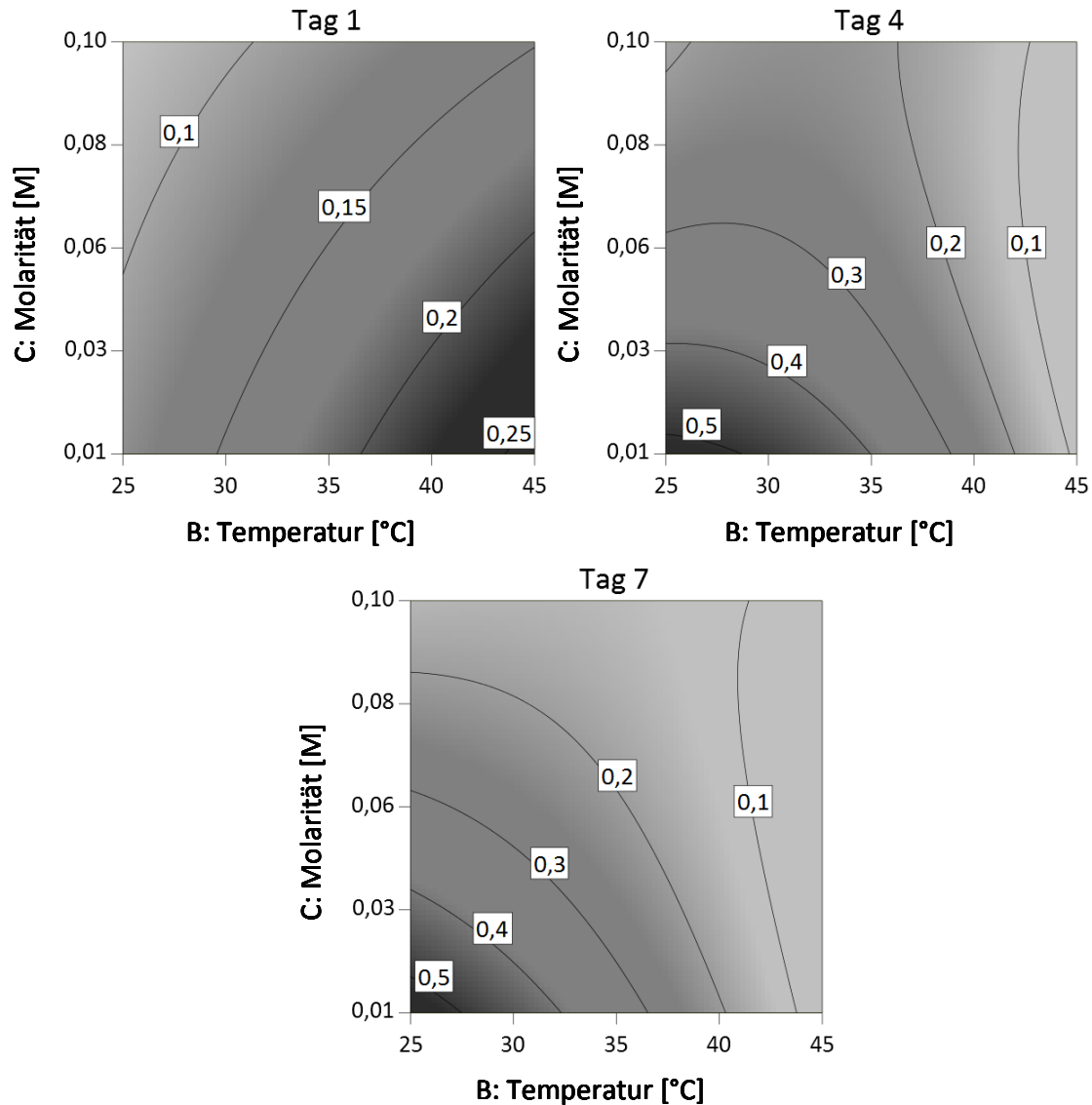


Abbildung 32 Konturplots bei pH 6,75 der Antwortvariablen  $Y_4$  Laminaritrioseproduktion an Tag 1,  $Y_5$  Laminaritrioseproduktion an Tag 4,  $Y_6$  Laminaritrioseproduktion an Tag 7. Die Konturplots verdeutlichen den Einfluss der Molarität und der Temperatur auf die Laminaribioseproduktion über eine Woche. Die Einheit der gegebenen Werte ist  $\mu\text{mol/g}$ . Die Produktion von Laminaritriose wurde mit 0,3 g LP-Hybridimmobilisaten mit 2 mL Substrat (0,05 mol/L G1P und Glu) getestet.

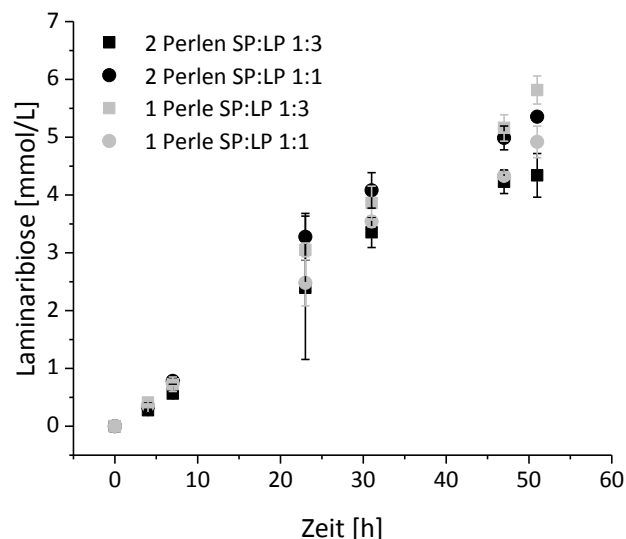
### 5.3.3.2 Festlegung bienzymatischer Bedingungen

Die Bedingungen, unter denen das bienzymatische System genutzt wird, sollten eine schnelle Phosphorolyse von Saccharose bei gleichzeitiger geringer Hydrolyse von Saccharose bzw. Glucose-1-phosphat ermöglichen und eine hohe Laminaribiosebildungsrate mit geringer Laminaritriosebildung unterstützen. Vor Festlegung der bienzymatischen Bedingungen wurden die Modellgleichungen für LP-Hybridimmobilisate gelöst. Das Ergebnis ist ein pH-Wert von 6, eine Temperatur von 34,6 °C und eine Molarität von 0,03 M. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass die Hydrolysereaktion der SP-Hybridimmobilisate vergleichbar mit SP-Sepabeads bei niedrigen Molaritäten verstärkt stattfindet. Aus diesem Grund wurde die Molarität für das bienzymatische System auf 0,05 M angehoben. Damit wurden die Bedingungen für ein bienzymatisches System auf **35 °C** in einem **0,05 M Natriumphosphatpuffer** mit **pH 6** festgelegt.

Ausgehend von der Hypothese, dass ein gemeinsamer Einschluss von SP- und LP-Sepabeads in Chitosan die Diffusionswege der Substrate und Produkte zwischen den Enzymen verkürzt und damit zu verbesserter Produktbildung führt, wurde die Anwendbarkeit der bienzymatischen Beziehungen mit getrennt eingeschlossenen und gemeinsam eingeschlossenen Enzymen untersucht. Dabei wurden die Enzyme in einem SP:LP Verhältnis von 1:1 und 1:3 eingeschlossen bzw. als getrennte Hybridimmobilisate eingewogen.

Wie Abbildung 33 zeigt, wurde in allen Versuchen Laminaribiose gebildet. Dies bestätigt, dass sich die gewählten Bedingungen für eine bienzymatische Produktion von Laminaribiose eignen. Es ist außerdem zu erkennen, dass keine der beiden Einschlussmethoden (getrennt oder gemeinsam) der jeweils anderen deutlich überlegen ist. So ist im Falle eines 1:1 Verhältnisses der getrennte Einschluss dem gemeinsamen überlegen.

Bei einem LP-Überschuss führt dagegen der gemeinsame Einschluss zu einer erhöhten Laminaribioseproduktion. Zusätzlich ist die Reaktionsdauer von Bedeutung, da erst bei langer Reaktionsdauer (> 48 h) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Konzepten erkennbar sind.



**Abbildung 33** Test auf gemeinsamen oder getrennten Einschluss von SP- und LP-Sepabeads. Die Laminaribiosebildung von 0,4 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (enthalten Sepabeads im Verhältnis 1:3 oder 1:1) und von 0,1 g SP-Hybridimmobilisaten mit 0,3 g LP-Hybridimmobilisaten sowie von 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten wurde mit 2 mL Substrat [0,2 mol/L Sac und 0,04 mol/L Glu in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)] bei 35 °C durchgeführt. (N = 3).

Die Entscheidung für einen gemeinsamen oder getrennten Einschluss sollte also systemabhängig getroffen werden. So kann es bei sehr großem LP-Überschuss von Vorteil sein, die Sepabeads gemeinsam einzuschließen, um eine bessere Verteilung der Enzyme im Reaktor zu erreichen.

Mit 2,6 % ist die Ausbeute im bienzymatischen Konzept (1 Perle SP:LP 1:3) noch gering. Dies kann aber durch Optimierung des Enzymverhältnisses, der Substratverhältnisse und -konzentrationen verbessert werden. Aufgrund der Vielzahl der Einflussfaktoren ist dafür eine simulationsgestützte Optimierung sinnvoll. Die Grundlage dafür, die weiterführende Charakterisierung der Enzyme unter bienzymatischen Bedingungen, ist im folgenden Kapitel beschrieben.

### 5.3.4 Charakterisierung der Enzyme unter bienzymatischen Bedingungen

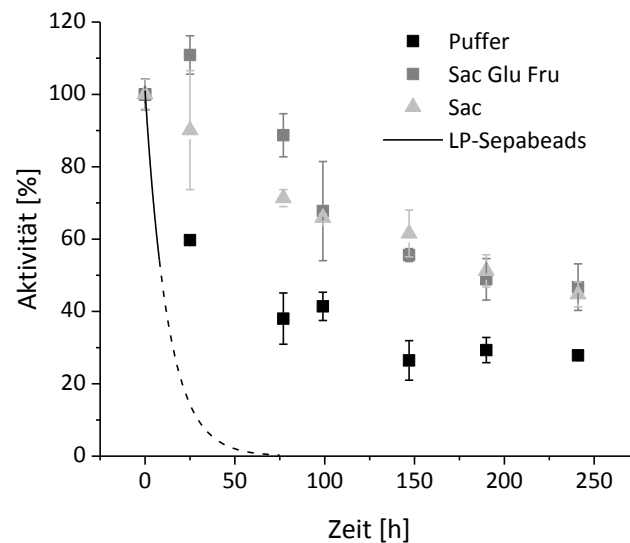
Die simulationsgestützte Entwicklung eines bienzymatischen Produktionssystems erfordert eine Charakterisierung der beteiligten Enzyme unter bienzymatischen Bedingungen. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich Laminaribiosephosphorylase charakterisiert. Vorländer [233] ermittelte die prozessrelevanten Daten für Sucrosephosphorylase.

#### 5.3.4.1 Stabilität und Wiederverwendbarkeit

Um festzustellen, ob sich die neuentwickelten Hybridimmobilisate für die (kontinuierliche) bienzymatische Produktion von Laminaribiose eignen, wurden sie hinsichtlich ihrer Wiederverwendbarkeit und Stabilität untersucht. Dazu wurde die Stabilität über Messung der Aktivität bei 35 °C in Puffer und in Anwesenheit von Substraten und Intermediaten des bienzymatischen Systems ermittelt.

Abbildung 34 zeigt, dass die Aktivität der Hybridimmobilisate in Natriumphosphatpuffer in den ersten 100 h der Inkubation stark abfällt, bevor sich die verbleibende Aktivität bei ca. 26 % der ursprünglichen Aktivität stabilisiert. Die Halbwertszeit der Hybridimmobilisate beträgt  $94,4 \pm 21,2$  h. Der Fit der Aktivität der LP-Sepabimmobilisate bei 37 °C zeigt einen stärkeren Abfall. Die LP-Sepabeadimmobilisate haben eine Halbwertszeit von nur  $8,9 \pm 1,5$  h. Damit liegt die Halbwertszeit der Hybridimmobilisate unter Prozessbedingungen um den Faktor 10 höher als die von Sepabeads unter Prozessbedingungen. Die Stabilität der LP-Hybridimmobilisate wurde zusätzlich in Anwesenheit von Saccharose und in Anwesenheit von Saccharose, Glucose und Fructose untersucht. Die Aktivität der LP-Hybridimmobilisate bei Anwesenheit von Di- und Monosacchariden ist nach 25 h höher als die Ausgangsaktivität. Dies lässt sich durch Glucose erklären, die nach dem Waschen noch in den Hybridimmobilisaten vorhanden ist. Dadurch beginnt die gemessene Produktbildung im Aktivitätstest früher. Der Effekt ist aber nur zu Beginn des Versuches relevant. Mit zunehmender Dauer gleicht sich die Aktivität der Immobilisate in komplexem Medium denen der Immobilisate in Saccharose an. Insgesamt ist die Aktivität und Stabilität der Immobilisate in Anwesenheit von Zuckern höher als nur in Puffer. Die Aktivität der Immobilisate stabilisiert sich bei ca. 45 % der Ausgangsaktivität der Immobilisate. Damit stabilisieren sie sich bei einer um 20 Prozentpunkte höheren Ausgangsaktivität als die Immobilisate in Puffer. Dies zeigt sich auch in den Halbwertszeiten. So beträgt die Halbwertszeit der Immobilisate in Saccharose  $202 \pm 13$  h und in Anwesenheit aller drei Zucker  $175 \pm 28$  h.

Die Stabilisierung der Immobilisate in Saccharose oder in Saccharose, Fructose und Glucose auf die gleiche Restaktivität deutet darauf hin, dass der Grund für die Stabilisierung die Anwesenheit von Saccharose ist. Eine Stabilisierung von LP durch Saccharose wurde bereits für das native Enzym beobachtet: die Halbwertszeit des nativen Enzyms erhöhte sich bei 37 °C von  $8,7 \pm 0,7$  h auf 19,8 h in Anwesenheit von 0,2 M Saccharose (Daten nicht gezeigt). Ein stabilisierender Effekt von Saccharose ist zudem ein gutes Argument für einen kontinuierlichen Prozess, da dadurch immer genügend Saccharose im Reaktionsmedium vorliegt, um eine Stabilisierung zu erreichen. Eine Stabilisierung von Enzymen durch Saccharose wurde beispielsweise auch von Kumar et al. [241] bei Chymotrypsin, James und McManus [242] für Lysozym, Hall et al. [243] für Lactatdehydrogenase, Onderková et al. [244] für Fructosyltransferase, Liu et al. [245] für  $\beta$ -Mannase, Rasouli et al. [246] für Luciferase und De Cordt et al. [247] sowie Samborska et al. [248] für  $\alpha$ -Amylase beobachtet wurde.

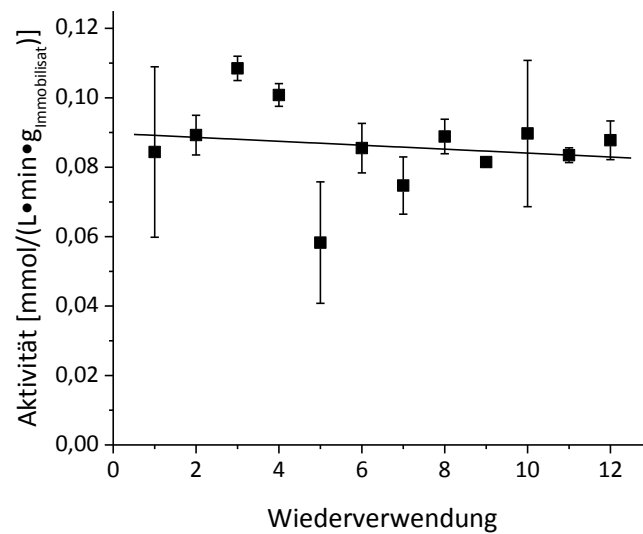


**Abbildung 34** Stabilität von LP-Hybridimmobilisaten bei 35 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) (schwarze Punkte), in 0,25 mol/L Saccharose in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) (hellgraue Dreiecke) und in 0,25 mol/L Saccharose, 0,05 mol/L Fructose und 0,025 mol/L Glucose in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) (dunkelgraue Vierecke). (N = 3). Die Enzyme wurden bei 35 °C in Puffer oder gepufferter Zuckerlösung inkubiert. Nach 0, 25, 77, 99, 147, 190 und 241 h wurden sie mit 2 mL Substrat auf Restaktivität überprüft. Als Substrat diente 12,5 mmol/L G1P und 87,5 mmol/L Glu in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6). Fit der LP-Sepabead-Stabilität bei 37 °C in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) (schwarze Linie) und extrapolierter Fit (gepunktete Linie) aus [229]. Abbildung nach Nach [223].

Die Ergebnisse zeigen auch, dass durch den Einschluss eine Erhöhung der Halbwertszeit um mindestens einen Faktor von 12 erreicht werden kann, da LP-Sepabeads in Anwesenheit der Substrate Glucose und Glucose-1-phosphat nur eine Halbwertszeit von  $16,9 \pm 0,8$  h aufweisen.

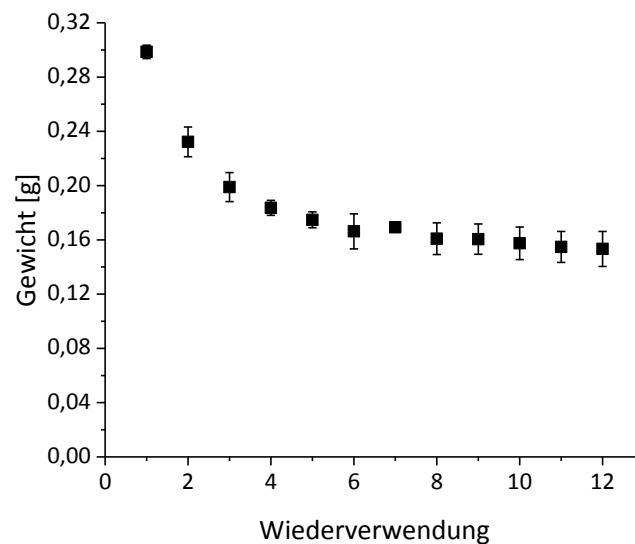
Abbildung 35 zeigt die Aktivität der LP-Hybridimmobilisate in 12 aufeinanderfolgenden 1-stündigen Batchversuchen. Dabei zeigt sich nicht nur die Stabilität der Aktivität, sondern auch die Stabilität bei Medienwechseln (Puffer-Substrate-Puffer) und Temperaturwechseln (35 °C – 4 °C). Der lineare Fit mit einer Steigung von  $-5,67E-4 \pm 1,1E-3$  zeigt, dass es zu keinem statistisch signifikanten Verlust an Aktivität kommt. Dies wiederum bedeutet, dass die Halbwertszeit der LP-Hybridimmobilisate in Anwesenheit ihrer Substrate nochmals höher ist als die Halbwertszeit in Anwesenheit von Saccharose  $[(202,1 \pm 13,1) \text{ h}]$ . Dass die Halbwertszeit des Enzyms in Anwesenheit von Glucose, Fructose und Saccharose nicht höher ist als in Anwesenheit von Saccharose allein, beweist, dass der stabilisierende Effekt auf Glucose-1-phosphat zurückzuführen ist. Es zeigt auch, dass es beim Recycling zu keinem Verlust von Enzym durch Scherung oder Ausbluten kommt.





**Abbildung 35** Wiederverwendung der LP-Hybridimmobilisate bei 35 °C. 0,3 g LP-Hybridimmobilisate wurden in 12 Aktivitätstests über 1 h wiederverwendet. Die Aktivitätstests wurden mit 2 mL Substrat durchgeführt. Als Substrat diente 12,5 m mol/L G1P und 87,5 mmol/L Glu in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6). Zwischen den Wiederverwendungen wurden die Immobilisate bei 4 °C in Puffer gelagert. [ $y = -5,67E-4 x + 0,09$  (Residual Sum of Squares 0,002; Pearson's  $r = 0,165$ ; Adj. R-Square -0,07)]. (N = 3). Nach [223].

Allerdings verlieren die Immobilisate im Laufe der Wiederverwendungsexperimente an Gewicht (Abbildung 36). Dabei tritt der stärkste Verlust bei der ersten Wiederverwendung auf. Nach 5-maliger Verwendung ist das Gewicht dann weitestgehend stabil. Da es zu keinen Aktivitätsverlusten kommt, ist der Gewichtsverlust vermutlich auf Abbau/Auswaschen der Cytosanmatrix zurückzuführen. Gleichzeitig mit dem Gewichtsverlust wurde eine Verringerung des Perlendurchmessers (nicht quantifiziert) beobachtet. Es kommt also zu einer Verdichtung der Partikel.

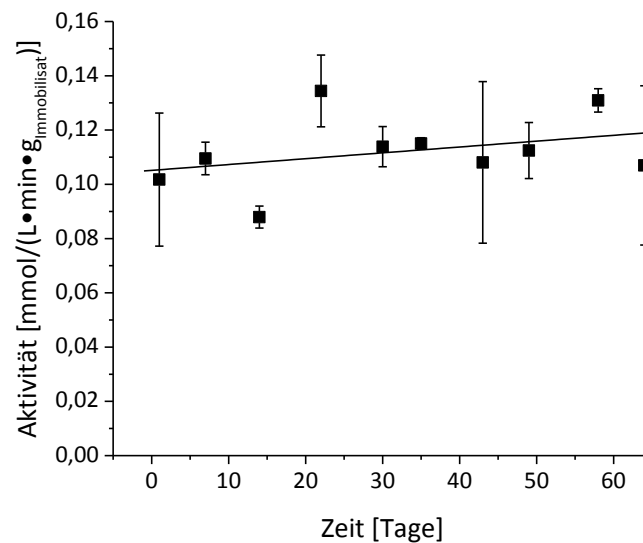


**Abbildung 36** Veränderung des Gewichts der LP-Hybridimmobilisate über 12-malige Wiederverwendung. Zu Beginn wurden 0,3 g LP-Hybridimmobilisate eingewogen. Vor dem Einwiegen der Immobilisate zur Bestimmung ihrer Aktivität wurden die Immobilisate dreimal bei 4 °C mit 5 mL Puffer für 10 min auf einem Rotator gewaschen. (N = 3).

Verschiedene operative Maßnahmen zum Umgang mit abnehmender Aktivität beim kontinuierlichen Betrieb von immobilisierten Enzymreaktoren, wie die Anpassung der Flussrate, um eine kontinuierliche Substratumsetzung zu gewährleisten, lassen sich bei Illanes et al. [249] nachlesen. •

#### 5.3.4.2 Lagerung

Die LP-Hybridimmobilisate wurden über 64 Tage in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) bei 4 °C gelagert. Die Ergebnisse in Abbildung 37 verdeutlichen, dass dabei die Aktivität der Immobilisate vollständig erhalten werden kann.



**Abbildung 37** Lagerung von LP-Hybridimmobilisaten bei 4 °C. Die Bestimmung der Aktivität bei 35 °C erfolgte mit 0,3 g Immobilisat in 2 mL Substrat [(12,5 mmol/L G1P und 87,5 mmol/L Glu in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)). (N = 3). [ $y = 2,15E-4 x + 0,11$  (Residual Sum of Squares 0,001; Pearson's r: 0,346; Adj. R-Square 0,009)]. Nach [223].

Die Experimente zur Wiederverwendung, Stabilität und Lagerung zeigen alle einen großen Fehler. Dieser ergibt sich aus der Verwendung von 0,3 g für die Versuche aus einem 50 g Batch. Dadurch ergibt sich ein größerer Fehler durch inhomogene Sepabeadverteilung in den Hybridimmobilisaten als in Versuchen, für die der gesamte Batch eingesetzt wird. Um diesen Effekt auszugleichen, wurde eine hohe Zyklenzahl (z. B. in der Wiederverwendung) gewählt, um Trends eindeutig sichtbar zu machen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immobilisate nicht nur bei Wiederverwendung sondern auch gegenüber Puffer- und Temperaturwechseln sehr stabil sind und während der Lagerung bei 4 °C über zwei Monate keine Aktivität verlieren. Damit eignen sich die Hybridimmobilisate sehr gut für die weitere Entwicklung des bienzymatischen Produktionssystems für Laminaribiose.

#### 5.3.4.3 Kinetik

In Kapitel „Optimierung der Immobilisierung“ wurde gezeigt, dass die Aktivität der Hybridimmobilisate von der eingeschlossenen Sepabeadmenge abhängig ist. So bietet der Feststoffanteil die Möglichkeit Aktivitäten einzustellen. Bei der Untersuchung des kinetischen Verhaltens wurden die kinetischen Parameter daher auf eingeschlossene Sepabeads bezogen. Gleichzeitig ermöglicht der Einschluss von mit Enzym beladenen Sepabeads die Möglichkeit der Herstellung bienzymatischer Hybridimmobilisate wie sie im Kapitel „Festlegung bienzymatischer Bedingungen“ untersucht wurde.

Für Sepabeads wurden monoenzymatische Kinetiken erstellt. Allerdings ist es möglich, dass die Kombination der monoenzymatischen Kinetiken ein bienzymatisches System nicht ausreichend beschreibt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde für Hybridimmobilisate neben monoenzymatischen Kinetiken die Kinetik von bienzymatischen Hybridimmobilisaten untersucht.

#### 5.3.4.3.1 Sucrosephosphorylase

Die Versuche zur Bestimmung der kinetischen Parameter von SP-Hybridimmobilisaten wurden mit einem Feststoffgehalt von 1,5 % durchgeführt. Es wurde das gleiche kinetische Modell wie für SP-Sepabeads vorausgesetzt, da nicht erwartet wurde, dass sich der Mechanismus ändert, sondern es nur zu einer Beeinflussung der kinetischen Parameter durch die Diffusion in Chitosan kommt. Es wurde also eine Phosphorolyse von Saccharose mit Bildung von Fructose und Glucose-1-phosphat nach einem Ping-Pong Mechanismus und die Hydrolyse von Saccharose unter Bildung von Fructose und Glucose angenommen. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die Aktivität von SP-Hybridimmobilisaten in 0,05 M Phosphatpuffer bei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen sowie in 0,25 M Saccharose bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen ermittelt.

Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40 zeigen, dass die Umsetzung von Saccharose und die Fructosebildung bei variiert Saccharose bzw. variiertem Phosphat von dem Modell ausreichend genau beschrieben werden kann. Die Übereinstimmung von modellierten Konzentrationsverläufen und Messwerten ist hoch. Bei hohen Saccharosekonzentrationen schwanken die Messwerte allerdings stark. Dies ist durch die sehr hohe Verdünnung erklärbar, die notwendig ist, um die Proben mittels HPAEC vermessen zu können. Der verstärkte Abfall der Saccharosekonzentration (siehe Abbildung 38) bzw. der etwas verlangsamte Anstieg der Fructosekonzentration (siehe Abbildung 39) in den ersten drei Minuten ist auf die Diffusion des Substrates in die Hybridimmobilisate bzw. die Diffusion der Fructose aus den Hybridimmobilisaten zurückzuführen.

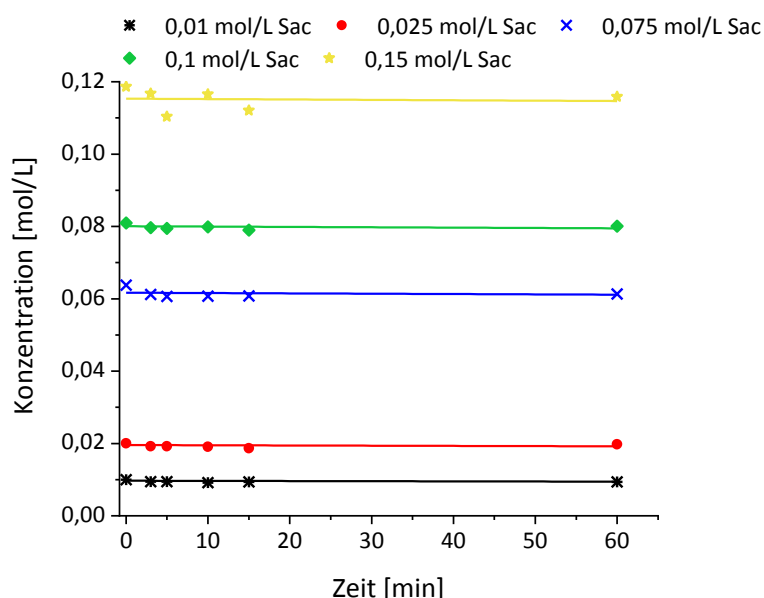
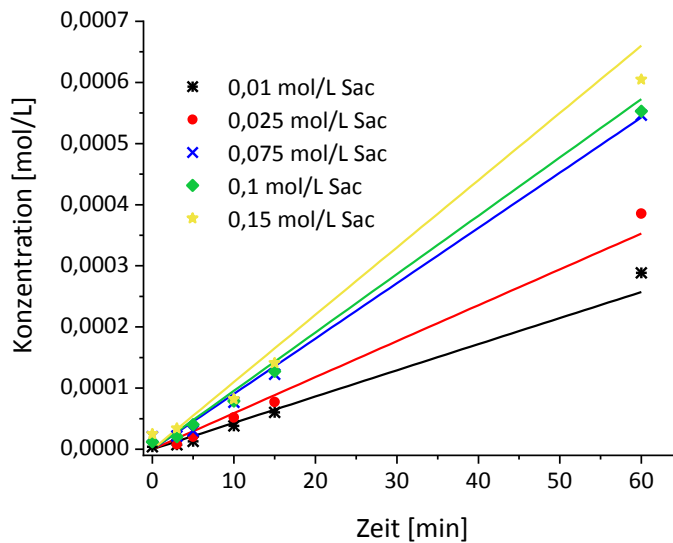


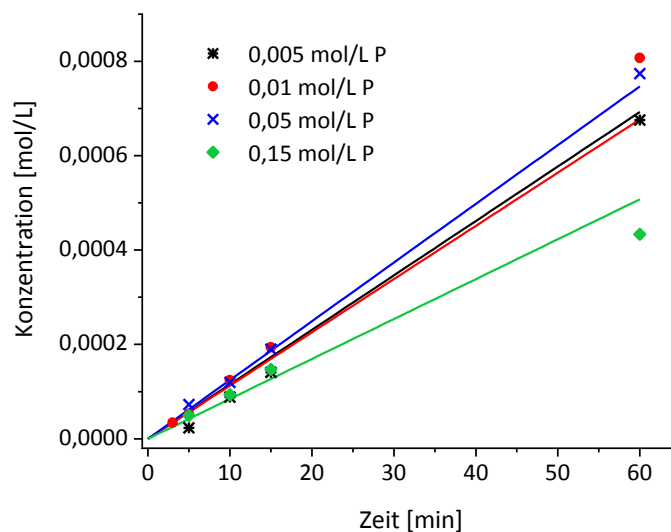
Abbildung 38 Zeitverlauf der Umsetzung von Saccharose mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

Der Vergleich der Fructosebildung bei variiert Saccharose bzw. variiertem Phosphat (Abbildung 39 und Abbildung 40) zeigt, dass die Fructosebildung bei 0,05 M Phosphat und variierten

Saccharosekonzentrationen etwas besser abgebildet werden kann als bei variierten Phosphatkonzentrationen und 0,25 mol/L Saccharose..

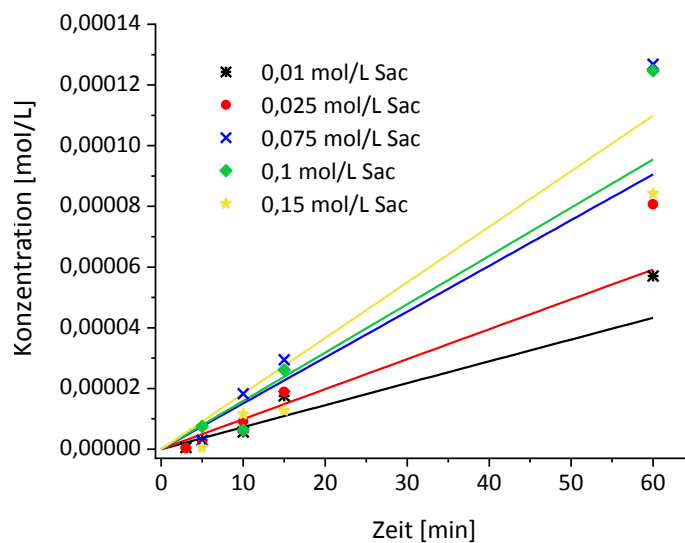


**Abbildung 39** Zeitverlauf der Bildung von Fructose mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

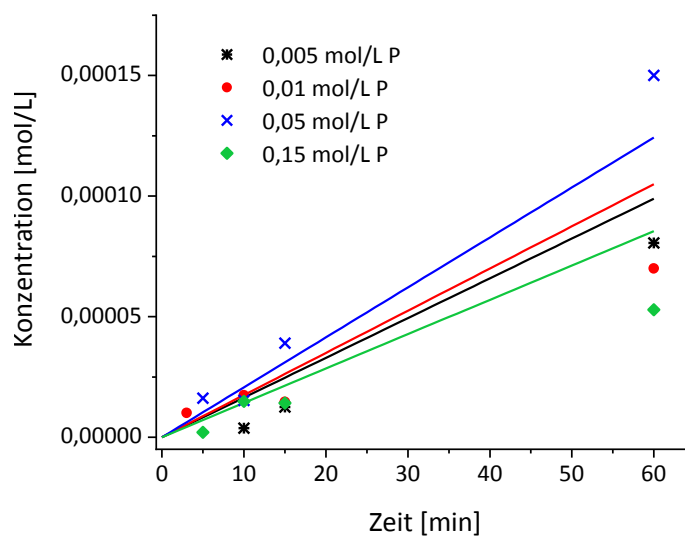


**Abbildung 40** Zeitverlauf der Bildung von Fructose mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in Natriumphosphatpuffer (pH 6)]. Die Saccharosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,25 mol/L. Die Phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Wie bereits bei den Untersuchungen zur Kinetik der Enzyme auf Sepabeads zeigt sich, dass das Modell Messwerte zu Reaktionsbeginn besser beschreibt. Die Fructosebildung wird dennoch gut vom Modell erfasst.



**Abbildung 41** Zeitverlauf der Bildung von Glucose-1-phosphat mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].



**Abbildung 42** Zeitverlauf der Bildung von Glucose-1-phosphat mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in Natriumphosphatpuffer (pH 6)]. Die Saccharosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,25 mol/L. Die Phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigen die Probleme des Modells, die Bildung von Glucose-1-phosphat zu beschreiben. Das ist zum großen Teil auf die stark schwankenden Messwerte zurückzuführen. Die geringen Glucose-1-phosphatkonzentrationen führen dazu, dass sich bei der Konzentrationsbestimmung von Glucose-1-phosphat Schwankungen der Basislinie bei der Messung stark auswirken und Messwerte damit stark verfälscht werden können.

Die Bildung von Glucose wird wie der Umsatz von Saccharose und die Bildung von Fructose gut durch das Modell beschrieben (Abbildung 43, Abbildung 44).

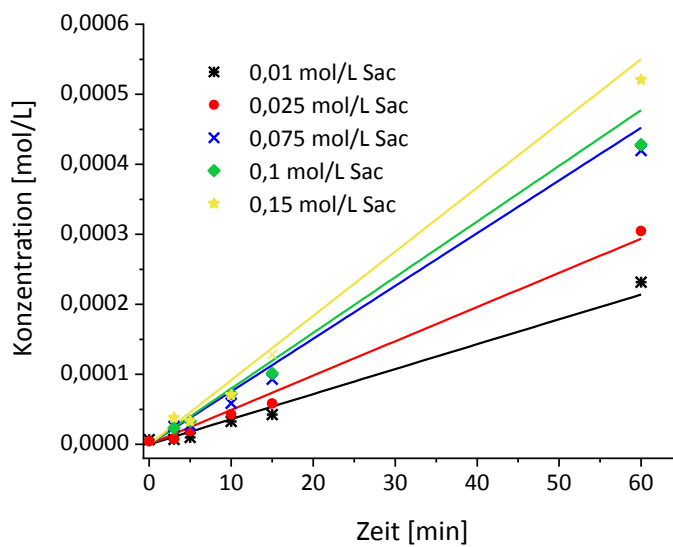


Abbildung 43 Zeitverlauf der Bildung von Glucose mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

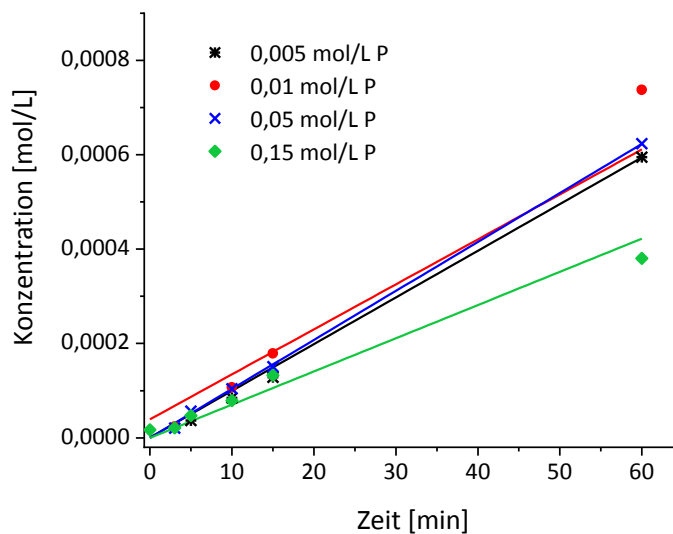


Abbildung 44 Zeitverlauf der Bildung von Glucose mit SP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g SP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in Natriumphosphatpuffer (pH 6)]. Die Saccharosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,25 mol/L. Die Phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Das Modell kann die Produktbildung (Glucose, Fructose, G1P) trotz der fehlerbehafteten Glucose-1-phosphatmessungen gut beschreiben ( $R^2$  0,977). Tabelle 38 fasst die ermittelten kinetischen Parameter der Phosphorolyse und Hydrolyse von Saccharose durch SP-Hybridimmobilisate zusammen.

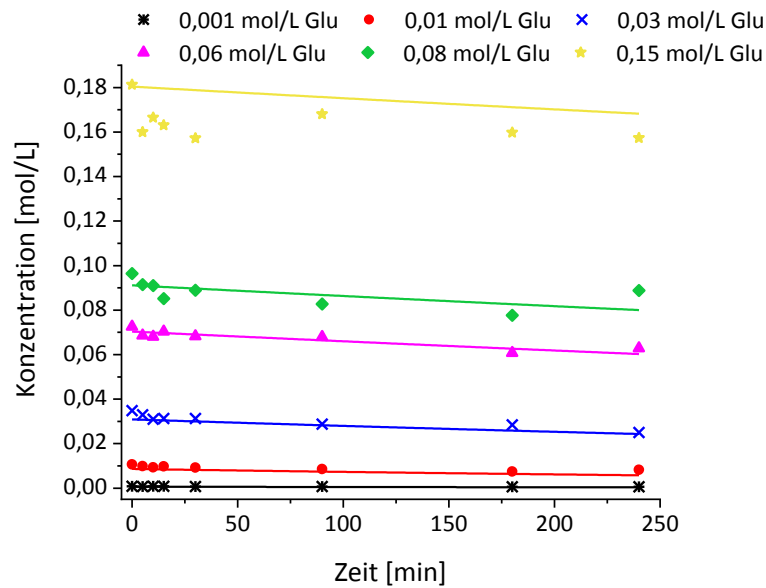
Tabelle 38 Kinetische Parameter von SP-Hybridimmobilisaten.  $v_{\max}$  wurde auf die Masse der eingeschlossenen Sepabeads bezogen, kalkuliert.

$K_{M,Sac}$ [mol/L]	$K_{M,P}$ [mol/L]	$v_{\max,S-Phos}$ [mol/(g·min)]	$v_{\max,S-Hyd}$ [mol/(g·min)]
2,072E-02	1,240E-03	1,568E-06	7,686E-06

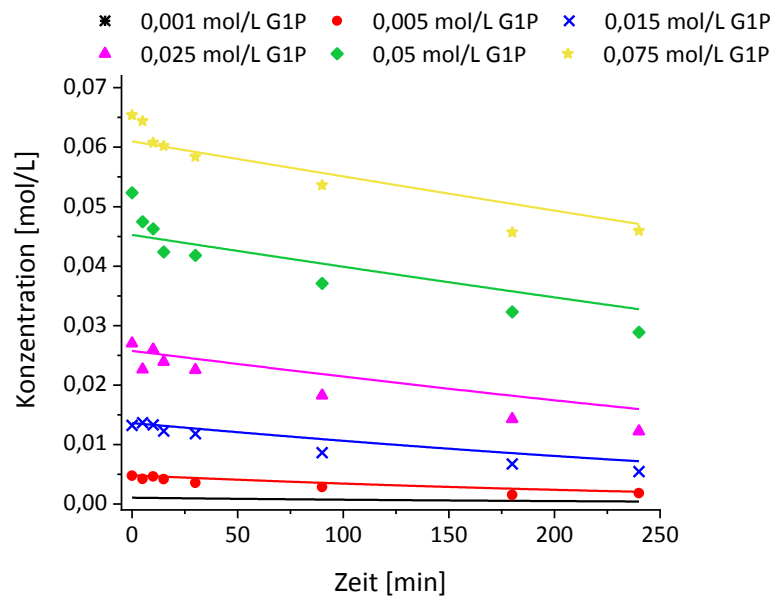
Die  $K_M$ -Werte für Phosphat und Saccharose zeigen, dass Phosphorolyse und Hydrolyse der Saccharose unter den gewählten bienzymatischen Bedingungen (0,05 M NaP-Puffer pH 6, 35 °C) aufgrund der hohen Affinitäten des Enzyms auch bei sehr niedrigen Saccharose- bzw. Phosphatkonzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit ablaufen. Die Affinität des Enzyms zu Phosphat ist höher als seine Affinität zu Saccharose. Im Gegensatz zu SP-Sepabeads ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse größer als die Geschwindigkeit der Phosphorolyse. Durch den Einschluss in Chitosan kommt es zu einer Halbierung der Phosphorolysegeschwindigkeit, während die Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor 2,7 steigt. Die Verringerung der Phosphorolysegeschwindigkeit wird begleitet von einer leichten Abnahme der Affinität des Enzyms zu Saccharose. Die Affinität des Enzyms zu Phosphat nimmt bei Einschluss in Chitosan dagegen stark ab. Insgesamt führt der Einschluss in Chitosan dazu, dass ein größerer Anteil der Saccharose hydrolysiert wird. Bei der Prozessgestaltung – insbesondere bei der Ermittlung der Glucosekonzentration als Cosubstrat – muss dies berücksichtigt werden.

#### **5.3.4.3.2 Laminaribiosephosphorylase**

Wie bei der Bestimmung der SP-Hybridimmobilisatkinetik wurde auch bei der LP-Hybridimmobilisatkinetik davon ausgegangen, dass der Einschluss in Chitosan zwar die kinetischen Parameter des Enzyms verändert, nicht aber den kinetischen Mechanismus. Zur Überprüfung wurde die Kinetik bei den optimalen Bedingungen für Sepabeads (0,05 M NaP pH 6, 37 °C) bestimmt. Die Reaktionsgleichungen entsprechen somit denen der Kinetik von LP-Sepabeads. Abbildung 45 und Abbildung 46 zeigen die modellierten Konzentrationsverläufe bei Variation von Glucose (Abbildung 45) und Variation von Glucose-1-phosphat (Abbildung 46) zusammen mit den gemessenen Konzentrationen von Glucose bzw. Glucose-1-phosphat. Das erstellte Modell zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten. Auffällig ist ein starkes Abfallen der gemessenen Konzentrationen zwischen 0 und 5 min, das vom Modell nicht beschrieben werden kann. Dabei handelt es sich um eine Verringerung der gemessenen Konzentration im Medium durch starke Diffusion des Substrats in die Hybridimmobilisate aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede. Da es sich nicht um eine enzymatische Reaktion handelt, kann sie vom Modell ohne Erweiterung der Reaktionsgleichungen um einen Diffusionsterm nicht erfasst werden. Aufgrund der größeren Konzentrationsunterschiede ist der Effekt bei hohen Substratkonzentrationen stärker ausgeprägt.



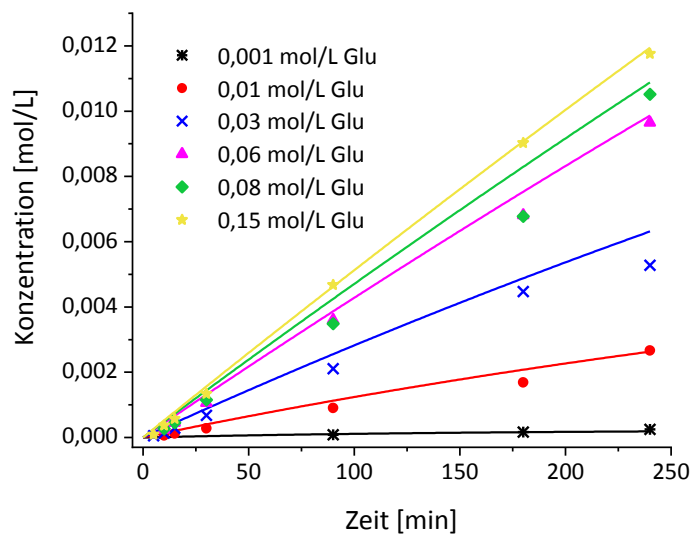
**Abbildung 45** Zeitverlauf der Umsetzung von Glucose mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucose-1-phosphatsubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,06 mol/L. Die Glucosekonzentrationen wurden variiert.



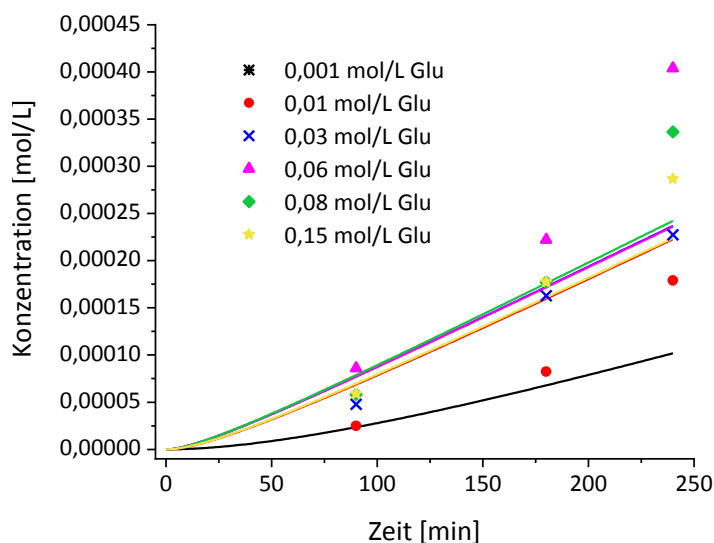
**Abbildung 46** Zeitverlauf der Umsetzung von Glucose-1-phosphat mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,3 mol/L. Die Glucose-1-phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Wird die Glucosesubstratkonzentration variiert, kann die Laminaribiosebildung (Abbildung 47) gut abgebildet werden, die Laminaritriosebildung (Abbildung 48) dagegen weniger gut. Für die schlechte Übereinstimmung von Modell und experimentellen Daten ist die geringe Anzahl der Messpunkte verantwortlich. Aufgrund der sehr niedrigen gemessenen Konzentrationen ist die Abweichung von Modell und Experiment dennoch gering.



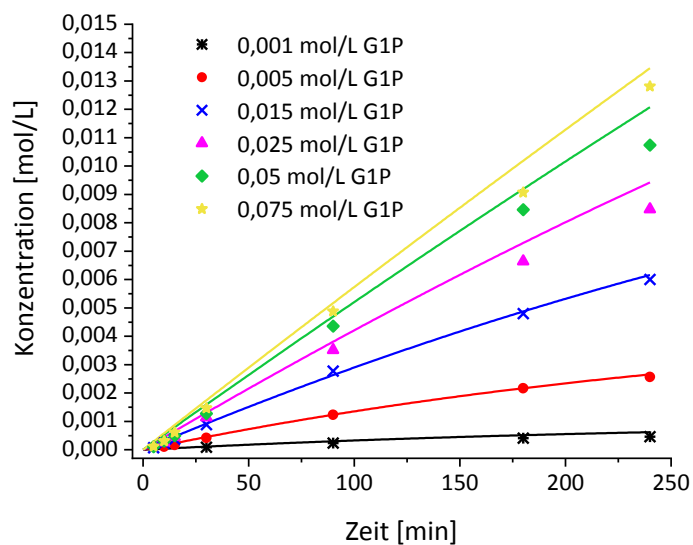


**Abbildung 47** Zeitverlauf der Bildung von Laminaribiose mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucose-1-phosphatsubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,06 mol/L. Die Glucosekonzentrationen wurden variiert.

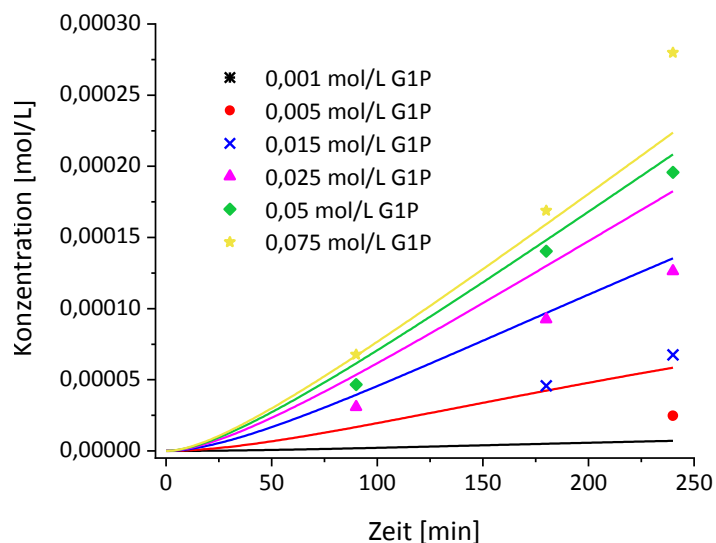


**Abbildung 48** Zeitverlauf der Bildung von Laminaritriose mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucose-1-phosphatsubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,06 mol/L. Die Glucosekonzentrationen wurden variiert.

Im Fall von variiert Glucose-1-phosphatstartkonzentration kann die Laminaribiosebildung (Abbildung 49) und die Laminaritriosebildung (Abbildung 50) angemessen beschrieben werden. Bei niedrigen Glucose-1-phosphatkonzentrationen kommt es jedoch zur Überschätzung der Laminaritriosebildung. Für eine Abschätzung des enzymatischen Verhaltens wurde die Beschreibung durch das Modell als angemessen betrachtet.



**Abbildung 49** Zeitverlauf der Bildung von Laminaribiose mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,3 mol/L. Die Glucose-1-phosphatkonzentrationen wurden variiert.



**Abbildung 50** Zeitverlauf der Bildung von Laminaritriose mit LP-Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 37 °C mit 0,2 g LP-Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3)]. Die Glucosesubstratkonzentration war in allen Versuchen 0,3 mol/L. Die Glucose-1-phosphatkonzentrationen wurden variiert.

Der Einschluss in Chitosan verändert die kinetischen Parameter (Tabelle 39). Die Laminaribiose-Bildungsgeschwindigkeit der LP-Sepabeads im monoenzymatischen System ist bei Chitosaneinschluss fast doppelt so hoch wie in Puffer (vgl. LP-Sepabeads:  $v_{\max, \text{Lam}}$  2,324E-05;  $v_{\max, \text{Lam3}}$  7,663E-06). Dagegen verringert sich die Bildungsgeschwindigkeit der Laminaritriose deutlich. Die Übereinstimmung der kinetischen Parameter der LP-Hybridimmobilisate mit den im bienzymatischen System ermittelten kinetischen Parametern der LP-Sepabeads ist größer (vgl. LP Sepabeads:  $v_{\max, \text{Lam}}$  7,399 E-05;  $v_{\max, \text{Lam3}}$  8,322 E-07) als die mit monoenzymatisch ermittelten Parametern. Die Affinität des Enzyms zu Glucose

nimmt mit der Hybridimmobilisierung zu. Es ist zu erwarten, dass sich die kinetischen Parameter unter den Optimalbedingungen für Hybridimmobilisate (0,05 M NaP pH 6, 35 °C) noch leicht verändern.

**Tabelle 39 Kinetische Parameter von LP-Hybridimmobilisaten.**  $V_{\max}$  wurde auf die Masse der eingeschlossenen Sepabeads bezogen, kalkuliert.

$K_{i,1}$ [mol/L]	$K_{i,G1P}$ [mol/L]	$K_{i,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,G1P}$ [mol/L]	$K_{M,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,Lam}$ [mol/L]	$V_{\max,Lam}$ [mol/(g·min)]	$V_{\max,Lam3}$ [mol/(g·min)]
0,449	2,555	0,055	5,229E-03	7,394E-04	1,792E-04	5,218E-05	8,744E-07

#### 5.3.4.3.3 Bienzymatische Hybridimmobilisate

Zur Untersuchung des bienzymatischen Systems, und um auch den Einfluss schwankender Phosphatkonzentrationen aufgrund der Aktivität der SP in der Kinetik berücksichtigen zu können, wurde die Kinetik bienzymatischer Hybridimmobilisate untersucht. Es wurden Hybridimmobilisate mit einem Feststoffgehalt von 1,5 % mit SP- und LP-Sepabeads im Verhältnis 1:2,38 zur Bestimmung der Kinetik eingesetzt. Die Aktivität der bienzymatischen Hybridimmobilisate wurde bei äquimolaren Saccharose- und Glucosekonzentrationen bestimmt. Zur Modellierung der Reaktion des bienzymatischen Systems wurden die Kinetiken der Einzelenzyme kombiniert. Während die Gleichungen für die Umsetzung von Saccharose, die Bildung von Fructose und Laminaribiose unverändert genutzt werden, werden für die Differentialgleichung für Glucose die Gleichungen für die Hydrolyse von Saccharose durch SP und die Bildung von Laminaribiose durch LP kombiniert:

$$\frac{d[Glc]}{dt} = \frac{v_{\max,S-Hyd}[Sac]}{K_{M,Sac} + [Sac]} - \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{i,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{i,G1P}K_{M,Glc}}{K_{i,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{i,1}}[Glc]^2} \quad (34)$$

Zur Beschreibung der zeitlichen Änderung der Glucose-1-phosphatkonzentration wird die Bildung von Glucose-1-phosphat durch SP mit der Umsetzung von Glucose-1-phosphat bei Bildung von Laminaribiose durch LP kombiniert:

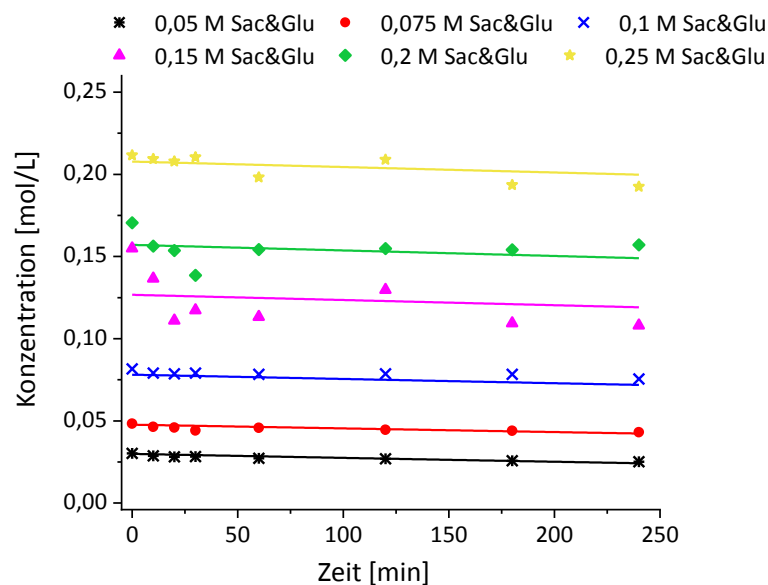
$$\frac{d[G1P]}{dt} = \frac{v_{\max,S-Phos}[Sac][P]}{K_{M,Sac}[P] + K_{M,P}[Sac] + [Sac][P]} - \frac{v_{\max,Lam}[G1P][Glc]}{K_{i,G1P}K_{M,Glc} + \left(K_{M,G1P} + \frac{K_{i,G1P}K_{M,Glc}}{K_{i,1}}\right)[Glc] + K_{M,Glc}[G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M,G1P}}{K_{i,1}}[Glc]^2} - \frac{v_{\max,Lam3}[Lam][G1P]}{\left(K_{M,Lam} + [Lam] + \frac{K_{M,Lam}}{K_{i,Glc}}[Glc]\right) + (K_{M,G1P} + [G1P])} \quad (35)$$

Die Differentialgleichung für Phosphat wird analog aufgestellt:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{-v_{\max, S-Phos}[Sac][P]}{K_{M, Sac}[P] + K_{M, P}[Sac] + [Sac][P]} + \frac{v_{\max, Lam}[G1P][Glc]}{K_{I, G1P}K_{M, Glc} + \left( K_{M, G1P} + \frac{K_{I, G1P} K_{M, Glc}}{K_{I, 1}} \right) [Glc] + K_{M, Glc} [G1P] + [G1P][Glc] + \frac{K_{M, G1P}}{K_{I, 1}} [Glc]^2} + \frac{v_{\max, Lam3}[Lam][G1P]}{\left( K_{M, Lam} + [Lam] + \frac{K_{M, Lam}}{K_{I, Glc}} [Glc] \right) + (K_{M, G1P} + [G1P])} \quad (36)$$

Die Daten aus den Versuchen mit unterschiedlichen äquimolaren Saccharose- und Glucosekonzentrationen wurden mithilfe von ModelMaker 3 an die Gleichungen angepasst ( $R = 0,950$ ). Abbildung 51 und Abbildung 52 zeigen die Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten für die Substrate Saccharose und Glucose.

Das Modell beschreibt die zeitliche Änderung beider Komponenten ausreichend gut. Wie schon bei Bestimmung der Einzelkinetiken sinken im Experiment die Konzentrationen in den ersten 5 min durch Diffusion in die Hybridimmobilisate. Dies kann vom Modell nicht erfasst werden. Insgesamt beschreibt das Modell die Verläufe bei niedrigen Konzentrationen besser.



**Abbildung 51** Zeitverlauf der Umsetzung von Saccharose mit bienzymatischen Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt, Verhältnis 1:2,38) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

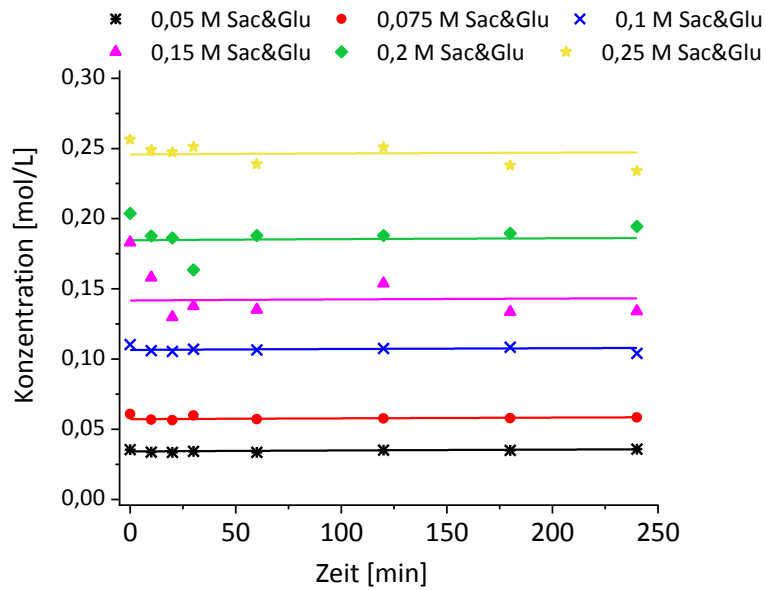


Abbildung 52 Zeitverlauf der Umsetzung von Glucose mit bienzymatischen Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt, Verhältnis 1:2,38) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

Abbildung 53 und Abbildung 54 zeigen, dass das Modell auch die Bildung des Nebenprodukts Fructose und des Zwischenprodukts Glucose-1-phosphat ausreichend abbilden kann. In einigen Versuchen schwanken die Messwerte sehr stark. Dies kann zum einen an der Analytik liegen oder aber an einer Überlagerung der Kinetik durch weitere nicht berücksichtigte Reaktionen wie der Hydrolyse von Glucose-1-phosphat.

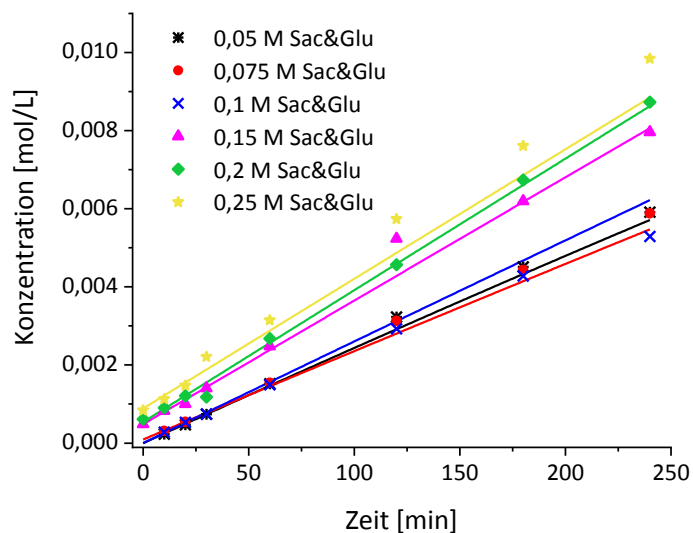
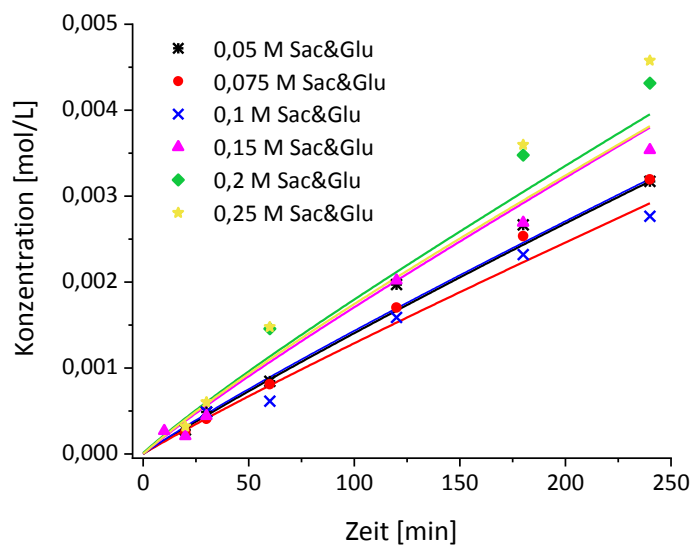
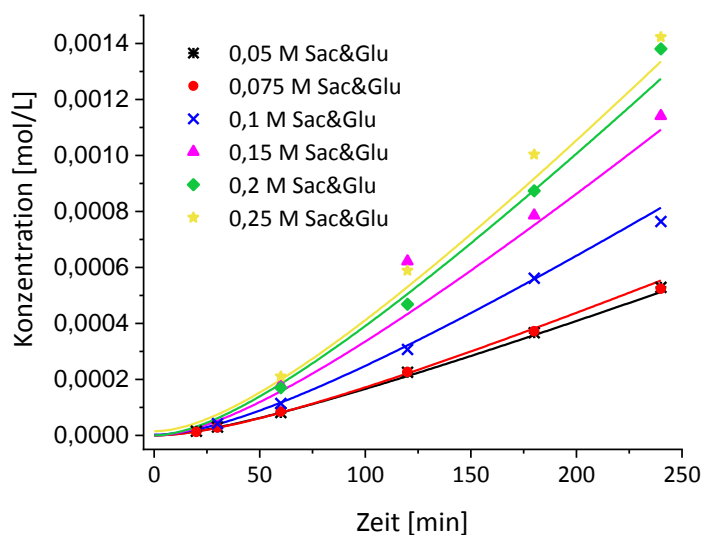


Abbildung 53 Zeitverlauf der Bildung von Fructose mit bienzymatischen Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt, Verhältnis 1:2,38) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].



**Abbildung 54** Zeitverlauf der Bildung von Glucose-1-phosphat mit bienzymatischen Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt, Verhältnis 1:2,38) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

Trotz der etwas schlechteren Beschreibung des Zwischenprodukts Glucose-1-phosphat kann die Bildung von Laminaribiose durch das Modell gut abgebildet werden (Abbildung 55). Da es im Experiment zu keiner Bildung von Laminaritriose oder höheren Oligosacchariden kam oder die gebildeten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze liegen, wurde die Bildung von Laminaritriose im Modell nicht berücksichtigt.



**Abbildung 55** Zeitverlauf der Bildung von Laminaribiose mit bienzymatischen Hybridimmobilisaten. Linien geben die modellierten Verläufe wieder. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 35 °C mit 0,2 g bienzymatischen Hybridimmobilisaten (1,5 % Sepabeadgehalt, Verhältnis 1:2,38) in 2 mL Substrat [in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6)].

Tabelle 40 fasst die ermittelten kinetischen Parameter für bienzymatische Hybridimmobilisate zusammen. Im Fall von SP ergeben sich höhere Phosphorolyse- und Hydrolysegeschwindigkeiten im

Vergleich zu den monoenzymatischen Hybridimmobilisaten. Während bei monoenzymatischen Hybridimmobilisaten die Phosphorolysegeschwindigkeit geringer als die Hydrolysegeschwindigkeit ist, ist es bei bienzymatischen Hybridimmobilisaten umgekehrt. Der  $K_M$ -Wert von Saccharose verändert sich kaum, der  $K_M$ -Wert von Phosphat ist im bienzymatischen System deutlich kleiner.

Für LP sind die Werte aufgrund unterschiedlicher Bedingungen (Temperatur, pH) schlechter vergleichbar. Auffällig ist dennoch, dass es aufgrund des sehr kleinen  $K_i$ -Wertes von Glucose zu einer Inhibierung durch Glucose kommt. Die Affinität des Enzyms zu Glucose-1-phosphat ist sehr hoch. Die Bildung von Laminaribiose ist deutlich geringer. Für SP zeigt der gegen Null gehende  $K_M$ -Wert für Phosphat wiederum, dass es sich bezogen auf Phosphat um eine Reaktion nullter Ordnung handelt.

**Tabelle 40 Kinetische Parameter von bienzymatischen Hybridimmobilisaten (Verhältnis SP:LP 1:2,38).  $V_{max}$  wurde auf die Masse der eingeschlossenen Sepabeads bezogen, kalkuliert.**

$K_{i,1}$ [mol/L]	$K_{i,G1P}$ [mol/L]	$K_{i,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,G1P}$ [mol/L]	$K_{M,Glc}$ [mol/L]	$K_{M,P}$ [mol/L]	$K_{M,Suc}$ [mol/L]
0,018	1,766E-04	1,86E-12	3,07E-16	0,151	1,21E-21	0,017
$V_{max,S-Phos}$ [mol/(g·min)]		$V_{max,S-Hyd}$ [mol/(g·min)]		$V_{max,Lam}$ [mol/(g·min)]		
6,18E-05		3,41E-05		1,61E-05		

Zur Untersuchung der Kinetik der bienzymatischen Hybridimmobilisate wurde die Aktivität des Enzyms bei äquimolaren Saccharose- und Glucosekonzentrationen untersucht. Das führt dazu, dass das enzymatische Verhalten bei einem hohen Überschuss an Saccharose gegenüber Glucose nicht beobachtet wurde. Aufgrund der hohen Glucosekonzentrationen wird Glucose immer in deutlichem Überschuss zu Glucose-1-phosphat und Laminaribiose vorliegen, sodass die Bildung höherer Oligosaccharide unterdrückt wird. Gleichzeitig wurde die Aktivität immer unter inhibierenden Glucosekonzentrationen bestimmt, was den Bedingungen in einem bienzymatischen System mit Glucose als Cosubstrat besser entspricht. Insgesamt wird die Aktivität unter dynamischen Bedingungen bestimmt, da die Enzyme sich in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. Die große Abweichung zu den monoenzymatischen Kinetiken zeigt deutlich, dass das Verhalten eines bienzymatischen Systems mit monoenzymatischen Kinetiken fehlerbehaftet beschrieben wird und es nötig ist, das System zusätzlich als Ganzes zu betrachten und die kinetischen Parameter entsprechend anzupassen.

## 5.4 Vergleich der Immobilisierungsmethoden und Träger

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Immobilisierungsmethoden haben Vor- und Nachteile und eignen sich mehr oder weniger gut für bestimmte Anwendungen. In Tabelle 41 wurden die Eigenschaften der verschiedenen Methoden und Träger sowie die der Immobilisate nochmals zusammengefasst.

Von den kovalenten Trägern [Sepabeads EC-EP/S, Purolite ECR8209 M (Epoxyträger) und Purolite ECR8309 M (Aldehydträger)] sind Sepabeads die mit dem geringsten Durchmesser und dem kleinsten Porendurchmesser. Aufgrund ihrer Größe lassen sie sich schlechter filtrieren und die Gefahr von Stofftransportlimitierungen ist aufgrund des geringen Porendurchmessers am größten. Allerdings weisen sie sowohl für SP als auch für LP die höchsten Immobilisierungseffizienzen bezogen auf die Restaktivität auf, gefolgt von Purolite ECR8209 M (Epoxyträger).

**Tabelle 41 Vergleich der verschiedenen Immobilisierungsmethoden.\* Daten aus [233].**

	Sepabeads EC-EP/S		Hybridimmobilisate		Purolite ECR8209 M		Purolite ECR8309 M	
Funktionelle Gruppen	Epoxy				Epoxy		Aldehyd	
Kapazität	100 $\mu\text{mol}_{\text{Epoxy}}/\text{g}$				50-100 $\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$		50-100 $\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$	
Größe[ $\mu\text{m}$ ]	100-300		1000-3000		300-710		300-710	
Porendurchmesser [ $\text{\AA}$ ]	100-200				600-1200		600-1200	
Filtrierbarkeit	schlecht		sehr gut		sehr gut		sehr gut	
Mechanische Stabilität	gut		Feststoffanteilabhängig		gut		gut	
Ungiftig	Ja		Ja		Ja		Nein	
	Sepabeads EC-EP/S		Hybridimmobilisate		Purolite ECR8209 M		Purolite ECR8309 M	
	SP	LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP
Restaktivität [%]	25	65	variabel bis 100	variabel bis 100	8	30	6	16
Multienzymatische Bedingungen	0,05 M NaP pH 6,3 37 °C		0,05 M NaP pH 6 35 °C		0,05 M NaP pH 6,1 41 °C		0,025 M NaP pH 6 41 °C	
Halbwertszeit (Puffer) [h]	7	9	69*	94				
Halbwertszeit (Wiederverwendung) [h]	18	17	115*	(>12 h ohne Verlust)	5	6		31
Aktivität nach Lagerung bei 4 °C über 4 Wochen [%]		100		100	90	100		
Eignung für bienzymatische Laminaribioseproduktion	ja, im Batch		ja, v. a. kontinuierlich		ja, im Batch		nein	



Eine Immobilisierung über Epoxygruppen erhält also im Vergleich zu Aldehydgruppen die Aktivität bei der Immobilisierung der Enzyme besser erhalten zu können. Dafür weisen Aldehydimmobilisate im Fall von LP die größte Stabilität (31 h bei 41 °C aus Aldehydimmobilisaten vgl. 17 h Sepabeads bei 37 °C). Die Halbwertszeit der LP ist bei den jeweiligen multienzymatischen Bedingungen auf Aldehydträgern beinahe doppelt so hoch, sodass die geringere erhaltene Aktivität teilweise kompensiert wird. Im Fall von SP führt die Immobilisierung auf Aldehydträgern allerdings zu einer so stark ausgeprägten Hydrolyse, dass die Immobilisierung nicht mehr sinnvoll ist. Ein weiterer Nachteil von Aldehydimmobilisaten ist der Einsatz von Glutardialdehyd zur Immobilisierung.

Insgesamt haben die Enzyme auf Purolite-Trägern eine höhere Optimaltemperatur im untersuchten Bereich.

Da sie für eine bienzymatische Produktion von Laminaribiose nicht geeignet sind, wurde die Lagerung der Aldehydimmobilisate bei 4 °C nicht untersucht. Während sich die Aktivität der Sepabeads und auch die Hybridimmobilisate bei Lagerung über vier Wochen nicht verändert, verliert SP auf Epoxyträgern leicht an Phosphorolyseaktivität und die Hydrolyseaktivität verstärkt sich.

Damit sind Sepabeads den Purolite-Trägern trotz deren erhöhten Temperaturoptimums im multienzymatischen Systems und der besseren Filtrierbarkeit in der bienzymatischen Produktion von Laminaribiose überlegen. Der Einsatz der kovalenten Träger ist aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit nur im Batchbetrieb sinnvoll.

Im Vergleich eignen sich die Hybridimmobilisate aufgrund ihrer hohen Halbwertszeiten besonders gut für eine kontinuierliche Produktion von Laminaribiose. Allerdings beschränkt die Größe der Partikel die Raum-Zeit-Ausbeuten, wenn auch durch Wahl eines geeigneten Feststoffgehaltes die gesamte Aktivität der auf Sepabeads immobilisierten Enzyme erhalten werden kann. Aufgrund der geringeren mechanischen Stabilität eignen sich die Hybridimmobilisate besonders gut für den Einsatz im Festbettreaktor.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich LP- und SP-Sepabeads gut für eine bienzymatische Batchproduktion von Laminaribiose eignen, aber eine trienzymatische Produktion aufgrund der niedrigen Optimaltemperaturen wenig sinnvoll ist. Die Alternativträger (ECR8209 M und ECR8309 M) zeigen zwar vielversprechende Eigenschaften, wie eine erhöhte Optimaltemperatur, eignen sich aber unter anderem aufgrund verstärkter Hydrolyseaktivität von SP und niedrigeren Immobilisierungseffizienzen weniger für die bienzymatische Laminaribioseproduktion.

Die Immobilisierung der Enzyme als Hybridimmobilisate erfordert zwar einen zweiten Immobilisierungsschritt, führt aber dafür zu einer Verbesserung der Stabilität der Enzyme, die eine kontinuierliche Produktion von Laminaribiose, auch mit reaktionsintegrierter Adsorption, ermöglicht. Die Möglichkeit einer kontinuierlichen Produktion von Laminaribiose mit SP- und LP-Hybridimmobilisaten wurde im Rahmen des Projekts von Akram Abi (persönliche Kommunikation) bewiesen und optimiert.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen zur Immobilisierung der Enzyme Sucrosephosphorylase, Glucoseisomerase und Laminaribiosephosphorylase und zu ihrem Einsatz in der Synthese von Laminaribiose. Dabei wurde die Immobilisierung im Hinblick auf den Einsatz in einem kontinuierlichen Prozess zur Produktion von Laminaribiose aus Saccharose mithilfe reaktionsintegrierter Adsorption optimiert und weiterentwickelt.

Ein Screening der Immobilisierungsmethoden Quervernetzung, Adsorption, Einschluss und kovalente Fixierung ergab, dass unter dem Aspekt einer stabilen Immobilisierung, die freie Proteine im Reaktionsraum verhindert, nur die kovalente Fixierung der Enzyme geeignet ist. Aufgrund des hohen Erhalts von 65 % der nativen Aktivität des laminaribiosebildenden Enzyms Laminaribiosephosphorylase und 25 % Aktivität von Sucrosephosphorylase wurden Sepabeads EC-EP/S als Trägermaterial zur kovalenten Fixierung ausgewählt. Glucoseisomerase stand als Granulat in immobilisierter Form zur Verfügung und konnte erfolgreich zusammen mit den auf Sepabeads EC-EP/S immobilisierten Enzymen zur trienzymatischen Produktion von Laminaribiose eingesetzt werden. Die immobilisierten Enzyme wurden mithilfe statistischer Versuchsplanung hinsichtlich ihrer Puffermolaritäts- und pH- sowie Temperaturpräferenzen charakterisiert. Da diese kaum eine Übereinstimmung zeigten, wurden die Bedingungen für ein trienzymatisches System verstärkt auf das den letzten Reaktionsschritt katalysierende Enzym Laminaribiosephosphorylase ausgerichtet und auf 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,3) und 37 °C festgelegt. Trienzymatische Versuche unter diesen Bedingungen zeigten, dass eine absatzweise Produktion von Laminaribiose im Mikroreaktionsgefäß (Ausbeute 13,3 %) und Batchreaktor (Ausbeute 14,9 %) prinzipiell möglich ist. Es zeigte sich allerdings auch, dass die Umsetzbarkeit des Systems stark durch Glucoseisomerase beeinträchtigt wird. Da die für die Laminaribiosebildung erforderliche Glucose zudem auch durch eine partielle Hydrolyse von Saccharose bereitgestellt wird, wurde die bienzymatische Produktion von Laminaribiose aus Saccharose und Glucose mit Sucrosephosphorylase und Laminaribiosephosphorylase einer trienzymatischen Produktion vorgezogen.

Die Charakterisierung der Enzyme hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften und Stabilitäten unter den gewählten Bedingungen zeigte, dass Laminaribiosephosphorylase auf Sepabeads EC-EP/S eine Halbwertszeit von  $8,9 \pm 1,5$  h in Abwesenheit seiner Substrate hat und eine von  $16,9 \pm 0,8$  h in Anwesenheit seiner Substrate. Sucrosephosphorylase weist eine Halbwertszeit von  $7,1 \pm 0,5$  h in Ab- und eine von  $18,0 \pm 0,7$  h in Anwesenheit von Saccharose auf. Die bienzymatische Produktion von Laminaribiose konnte mit Ausbeuten von 20 % praktisch exemplarisch umgesetzt werden und kann auf Basis der kinetischen Daten und ermittelten Stabilitätsdaten in Matlab/Modelmaker simuliert/modelliert werden.

Da die Stabilität der immobilisierten Enzyme für eine kontinuierliche Produktion nicht ausreichend ist, wurden verschiedene Biopolymere zum Einschluss der auf Sepabeads immobilisierten Enzyme gescreent. Der Einschluss sollte die Stabilität der Enzyme verbessern. Es zeigte sich, dass der Einschluss von Laminaribiosephosphorylase auf Sepabeads EC-EP/S in einer 1,5 %-igen Chitosanlösung in 1,5 % Essigsäure, deren pH-Wert zuvor mit NaOH auf 4,75 angehoben wurde, bei Feststoffgehalten von 3 % und weniger ohne Aktivitätsverluste möglich ist. Für Sucrosephosphorylase zeigte sich bei Feststoffgehalten von 2,5 % dass  $89 \pm 5$  % der Aktivität des auf Sepabeads EC-EP/S immobilisierten Enzyms erhalten bleibt. Ein gemeinsamer Einschluss der Enzyme in Chitosan ist möglich und kann unter

bestimmten Bedingungen Vorteile haben. Die Immobilisate wurden als Hybridimmobilisate bezeichnet und besitzen im Vergleich zu Sepabeadimmobilisaten eine verbesserte Langzeitstabilität.

Nach Charakterisierung der Laminaribiosephosphorylase mithilfe statistischer Versuchsplanung wurden die Bedingungen für die bienzymatische Produktion von Laminaribiose auf 0,05 M Natriumphosphatpuffer mit pH 6 und 35 °C festgelegt und die Umsetzbarkeit bewiesen (Ausbeute 2,6 %).

Die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Enzyme und der Stabilität der Laminaribiosephosphorylase ergab eine hohe Wiederverwendbarkeit und operationale Stabilität. Im Fall von Laminaribiosephosphorylase erhöht sich die Halbwertszeit von  $94 \pm 21$  h in Puffer in Anwesenheit von Saccharose auf  $202 \pm 13$  h.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immobilisierung der Enzyme zur multienzymatischen Synthese von Laminaribiose über kovalente Fixierung auf Sepabeads EC-EP/S optimiert, die Immobilisate charakterisiert und erfolgreich zur absatzweisen trienzymatischen Produktion aus Saccharose und zur bienzymatischen Produktion aus Saccharose und Glucose eingesetzt. Aufgrund der begrenzten Halbwertszeiten der Immobilisate wurde die Immobilisierungsmethode um den Einschluss der Immobilisate in Chitosan erweitert und auf diese Weise eine Stabilisierung der Enzyme erzielt, die die Umsetzung einer kontinuierlichen Produktion von Laminaribiose ermöglicht.

## 7 Ausblick

Die Fülle an Literatur zu multienzymatischen Synthesen zeigt die Möglichkeiten und Chancen dieser Herangehensweise. Besonders interessant sind multienzymatische Synthesen dann, wenn sie die Produktion komplexer Verbindungen wie z. B.: Oligosaccharide aus billigen und nachwachsenden Rohstoffen ermöglichen. Die multienzymatische Synthese von Laminaribiose stellt daher ein sehr interessantes System dar, das die Vorteile von enzymatischen Katalysen gegenüber chemischen Synthesen aufzeigen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Immobilisierung der Enzyme untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die sehr unterschiedlichen Optimalbedingungen der Enzyme ein großes Hindernis darstellen. So wird die eingesetzte Glucoseisomerase üblicherweise bei etwa 60 °C im HFCS eingesetzt, während die Sucrose – und Laminaribiosephosphorylase bei moderateren Temperaturen stabil sind. Hier stellt die thermostabile Saccharosephosphorylase aus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* [31] eine Chance dar. In den letzten Jahren wurden außerdem zahlreiche Glucoseisomerasen beschrieben (z. B.: [214], [51], [215], [216]), die sich für den Einsatz in der Ethanolherstellung eignen und damit auch für die Produktion von Laminaribiose bei moderaten Temperaturen in Frage kommen. Zusätzlich sind weitere Laminaribiosephosphorylasen aus *Paenibacillus sp.* YM-1 [206] bzw. *Acholeplasma laidlawii* [207] bekannt, die weniger Oligosaccharide bilden.

Ein limitierender Faktor des Systems ist die hohe Hydrolyserate der Saccharosephosphorylase. Dieses Problem könnte durch Immobilisierung des Enzyms in Anwesenheit von Saccharose und Phosphat reduziert werden. Auf diese Weise wäre es möglich, dass es während der Immobilisierung zu einer Stabilisierung der Konformation kommt, die die Phosphorolyseaktivität fördert und die Hydrolyseaktivität verringert.

Das kinetische Verhalten konnte bisher nur anfänglich beschrieben werden. Daher sollten zur besseren Beschreibung des enzymatischen Verhaltens und des bienzymatischen Systems, vor allem im Fall von Hybridimmobilisaten, die Diffusions- und Verteilungskoeffizienten aller Substrate, Intermediate und Produkte untersucht und berücksichtigt werden. Außerdem sollte die Konzentration des Phosphats im bienzymatischen System und die Aktivität der Laminaribiosephosphorylase genauer untersucht werden und eine Produktion unter Zufütterung von Phosphat in Betracht gezogen werden. Im Falle von Sepabeads sollte die Bildung höherer Oligosaccharide im Modell berücksichtigt werden. Da die Sensitivität der Detektion mit zunehmender Kettenlänge abnimmt, sind hierzu Versuche mit langer Laufzeit und Untersuchungen mit Laminaribiose als Substrat nötig. Die Rückreaktion von Laminaribiose zu Glucose und Glucose-1-phosphat sollte ebenfalls genauer untersucht werden und bei Bedarf im Modell berücksichtigt werden.

Auch die Perlengröße der Hybridimmobilisate sollte mit einbezogen werden, um die Länge der Diffusionswege beschreiben und berücksichtigen zu können.

Insgesamt wird eine verbesserte Modellierung des Systems eine genauere Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Enzymverhältnisse, Substratverhältnisse ermöglichen.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] B. Zechendorf, Sustainable development: how can biotechnology contribute?, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 219–225. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01297-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01297-9).
- [2] W.L. Tang, H. b Zhao, Industrial biotechnology: Tools and applications, *Biotechnol. J.* 4 (2009) 1725–1739. doi:[10.1002/biot.200900127](https://doi.org/10.1002/biot.200900127).
- [3] W. Soetaert, E. Vandamme, The impact of industrial biotechnology, *Biotechnol. J.* 1 (2006). doi:[10.1002/biot.200600066](https://doi.org/10.1002/biot.200600066).
- [4] S. Rupp, Next-generation bioproduction systems: Cell-free conversion concepts for industrial biotechnology, *Eng. Life Sci.* 13 (2013) 19–25. doi:[10.1002/elsc.201100237](https://doi.org/10.1002/elsc.201100237).
- [5] D.J. Pollard, J.M. Woodley, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 66–73. doi:[10.1016/j.tibtech.2006.12.005](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.12.005).
- [6] I. Eş, J.D.G. Vieira, A.C. Amaral, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2065–2082. doi:[10.1007/s00253-015-6390-y](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y).
- [7] U.T. Bornscheuer, K. Buchholz, Highlights in Biocatalysis – Historical Landmarks and Current Trends, *Eng. Life Sci.* 5 (2005) 309–323. doi:[10.1002/elsc.200520089](https://doi.org/10.1002/elsc.200520089).
- [8] F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert, Multi-enzymatic synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 174–183. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.023>.
- [9] P.A. Santacoloma, G. Sin, K. V. Gernaey, J.M. Woodley, Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis, *Org. Process Res. Dev.* 15 (2011) 203–212. doi:[10.1021/op1002159](https://doi.org/10.1021/op1002159).
- [10] A.T. Bull, A.W. Bunch, G.K. Robinson, Biocatalysts for clean industrial products and processes, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 246–251. doi:[10.1016/S1369-5274\(99\)80043-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80043-5).
- [11] A.T. Bull, Biotechnology for industrial sustainability, *Korean J. Chem. Eng.* 18 (2001) 137. doi:[10.1007/BF02698451](https://doi.org/10.1007/BF02698451).
- [12] M.L. Sanz, G.R. Gibson, R.A. Rastall, Influence of Disaccharide Structure on Prebiotic Selectivity in Vitro, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5192–5199. doi:[10.1021/jf050276w](https://doi.org/10.1021/jf050276w).
- [13] F. Jamois, F. Le Goffic, J.C. Yvin, D. Plusquellec, V. Ferrières, How to improve chemical synthesis of laminaribiose on a large scale, *Open Glycosci.* (2008) 19–24. doi:[10.2174/1875398100801010019](https://doi.org/10.2174/1875398100801010019).
- [14] E.B. Mearls, D.G. Olson, C.D. Herring, L.R. Lynd, Development of a regulatable plasmid-based gene expression system for *Clostridium thermocellum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015). doi:[10.1007/s00253-015-6610-5](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6610-5).
- [15] T. Waluga, Zur Prozessgestaltung von Enzymkatalysen mit reaktionsintegrierter Adsorption, 1st ed., Germany Cuvillier, Göttingen, 2013.
- [16] E. Ohno, H. Miyafuji, Production of disaccharides from glucose by treatment with an ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride, *J. Wood Sci.* (2014). doi:[10.1007/s10086-014-1453-8](https://doi.org/10.1007/s10086-014-1453-8).
- [17] L.-X. Wang, N. Sakairi, H. Kuzuhara, Peracetylated laminaribiose: preparation by specific degradation of curdlan and its chemical conversion into N-acetylhyalobiuronic acid, *Carbohydr.*

Res. 219 (1991) 133–148. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)89048-K](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(91)89048-K).

- [18] E. Ricca, B. Brucher, J.H. Schrittwieser, Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2239–2262. doi:10.1002/adsc.201100256.
- [19] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering., *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2 (2012) e201209017. doi:10.5936/csbj.201209017.
- [20] T. Boller, C. Meier, S. Menzler, EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis, *Org. Process Res. Dev.* 6 (2002) 509–519. doi:10.1021/op015506w.
- [21] A. Illanes, Introduction, in: A. Illanes (Ed.), *Enzym. Biocatal. Princ. Appl.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2008: pp. 1–56. doi:10.1007/978-1-4020-8361-7\_1.
- [22] B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 126–139. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [23] R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts, *Org. Process Res. Dev.* 15 (2011) 213–223. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79251469073&partnerID=40&md5=fa89033931131c9ed3dbeb83c633c732>.
- [24] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 1st ed., Wiley VCH, Weinheim, 2000.
- [25] A. Illanes, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, L. Wilson, Heterogeneous Enzyme Kinetics, in: A. Illanes (Ed.), *Enzym. Biocatal. Princ. Appl.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2008: pp. 155–203. doi:10.1007/978-1-4020-8361-7\_4.
- [26] S. Panke, M.G. Wubbolts, Enzyme technology and bioprocess engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 111–116. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00302-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00302-6).
- [27] S. Jemli, D. Ayadi-Zouari, H. Ben Hlima, S. Bejar, Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes., *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (2016) 246–58. doi:10.3109/07388551.2014.950550.
- [28] F. Jia, B. Narasimhan, S. Mallapragada, Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 209–222. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84890796816&partnerID=40&md5=ef64b51bf1e5ee54c165c338503e773b>.
- [29] F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 70–75. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.05.021.
- [30] Y. Li, Q. Ding, L. Ou, Y. Qian, J. Zhang, One-pot process of 2'-deoxyguanylic acid catalyzed by a multi-enzyme system, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 20 (2015) 37–43. doi:10.1007/s12257-014-0392-y.
- [31] P. Qi, C. You, Y.-H.P. Zhang, One-Pot Enzymatic Conversion of Sucrose to Synthetic Amylose by using Enzyme Cascades, *ACS Catal.* 4 (2014) 1311–1317. doi:10.1021/cs400961a.
- [32] Y.-H. Yang, Y.-B. Kang, D.-H. Kim, T.-H. Lee, S.-H. Park, K. Lee, D. Yoo, K. Liou, H.-C. Lee, J.-K. Sohng, B.-G. Kim, One-pot enzymatic synthesis of deoxy-thymidine-diphosphate (TDP)-2-deoxy-

- $\alpha$ -d-glucose using phosphomannomutase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62 (2010) 282–287. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.008>.
- [33] M. Nishimoto, M. Kitaoka, One-pot enzymatic production of  $\beta$ -d-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy-d-galactose (galacto-N-biose) from sucrose and 2-acetamido-2-deoxy-d-galactose (N-acetylgalactosamine), *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 2573–2576. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.031>.
- [34] S. Del Prete, V. De Luca, C. Capasso, C.T. Supuran, V. Carginale, Recombinant thermoactive phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Thermosynechococcus elongatus* and its coupling with mesophilic/thermophilic bacterial carbonic anhydrases (CAs) for the conversion of CO<sub>2</sub> to oxaloacetate., *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 220–5. doi:10.1016/j.bmc.2015.12.005.
- [35] I. Maru, J. Ohnishi, Y. Ohta, Y. Tsukada, Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-d-glucosamine and pyruvate using N-acyl-d-glucosamine 2-epimerase and N-acetylneuraminate lyase, *Carbohydr. Res.* 306 (1998) 575–578. doi:10.1016/S0008-6215(97)10106-9.
- [36] J. Liu, Y. Zou, W. Guan, Y. Zhai, M. Xue, L. Jin, X. Zhao, J. Dong, W. Wang, J. Shen, P.G. Wang, M. Chen, Biosynthesis of nucleotide sugars by a promiscuous UDP-sugar pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* (AtUSP), *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 3764–3768. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84878837319&partnerID=40&md5=d5ec7b7611b13a03b5967e89d16f36b7>.
- [37] K. Inoue, M. Nishimoto, M. Kitaoka, One-pot enzymatic production of 2-acetamido-2-deoxy-d-galactose (GalNAc) from 2-acetamido-2-deoxy-d-glucose (GlcNAc), *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 2432–2436. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.08.032>.
- [38] M. Kitaoka, T. Sasaki, H. Taniguchi, Conversion of Sucrose into Cellobiose Using Sucrose Phosphorylase, Xylose Isomerase and Cellobiose Phosphorylase, *J. Japanese Soc. Starch Sci.* 39 (1992) 281–283.
- [39] M. Kitaoka, T. Sasaki, H. Taniguchi, Conversion of Sucrose into Laminaribiose Using Sucrose Phosphorylase, Xylose Isomerase and Laminaribiose Phosphorylase, *J. Japanese Soc. Starch Sci.* 40 (1993) 311–314.
- [40] A. Schmid, F. Hollmann, J.B. Park, B. Bühler, The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 359–366. doi:10.1016/S0958-1669(02)00336-1.
- [41] T.. Narancic, R.. Davis, J.. Nikodinovic-Runic, K.E.. O’ Connor, Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory, *Biotechnol. Lett.* 37 (2015) 943–954. doi:10.1007/s10529-014-1762-4.
- [42] J.B. va. Beilen, Z. Li, Enzyme technology: An overview, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 338–344. doi:10.1016/S0958-1669(02)00334-8.
- [43] B.. Schulze, M.G.. Wubbolts, Biocatalysis for industrial production of fine chemicals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 609–615. doi:10.1016/S0958-1669(99)00042-7.
- [44] I. Ardao, A.-P. Zeng, In silico evaluation of a complex multi-enzymatic system using one-pot and modular approaches: Application to the high-yield production of hydrogen from a synthetic metabolic pathway, *Chem. Eng. Sci.* 87 (2013) 183–193. doi:10.1016/j.ces.2012.10.005.
- [45] D.. Vasič-Racki, M.. Jonas, C.. Wandrey, W.. Hummel, M.R.. Kula, Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) 215–222.

doi:10.1007/BF00258398.

- [46] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, Understanding enzyme immobilisation, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 453–468. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-62449121836&partnerID=40&md5=70ed62a73a43aca86c0c335548fa621d>.
- [47] J.M. Woodley, Reaction and Process Engineering, in: *Enzym. Catal. Org. Synth.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012: pp. 217–247. doi:10.1002/9783527639861.ch7.
- [48] A. Liese, L. Hilterhaus, Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6236–6249. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880105717&partnerID=40&md5=08fffa90d2e6763c5d0aadf637a8251a>.
- [49] R.A. Sheldon, Enzyme immobilization: The quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289–1307. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547209337&partnerID=40&md5=2489c8508a12466262473801dd1c25b3>.
- [50] A. Lehmacher, H. Bisswanger, Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *thermus aquaticus* HB 8, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 679–686.
- [51] P. Chandrakant, V.S. Bisaria, Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5 (2000) 32–39. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0242531198&partnerID=tZ0tx3y1>.
- [52] R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®): Stable and recyclable biocatalysts, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1583–1587. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-37749006119&partnerID=40&md5=121781a7e5f9c1f6f9712be75d2cecbd>.
- [53] J. Lima-Ramos, W. Neto, J.M. Woodley, Engineering of Biocatalysts and Biocatalytic Processes, *Top. Catal.* 57 (2013) 301–320. doi:10.1007/s11244-013-0185-0.
- [54] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235. doi:10.1039/C3CS60075K.
- [55] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, *Org. Process Res. Dev.* 6 (2002) 446–451. doi:10.1021/op0200165.
- [56] C. Mateo, J.M. Palomo, L.M. Van Langen, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates, *Biotechnol. Bioeng.* 86 (2004) 273–276. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2342420355&partnerID=40&md5=1a1a4613af9983ed9fc5432ded0638d1>.
- [57] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, L. Gardossi, Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6262. doi:10.1039/c3cs35464d.
- [58] S. Liu, Chapter 8 - Enzymes, in: S. Liu (Ed.), *Bioprocess Eng.*, Elsevier, Amsterdam, 2013: pp. 323–390. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59525-6.00008-1.
- [59] S. Talekar, A. Pandharbale, M. Ladole, S. Nadar, M. Mulla, K. Japhalekar, K. Pattankude, D. Arage, Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): A tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity, *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 269–275.



doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.035>.

- [60] M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimani, M.E. Sedaghat, Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Appl. Clay Sci.* 43 (2009) 289–295. doi:10.1016/j.clay.2008.09.008.
- [61] B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera, Immobilization of Enzymes: A Literature Survey, in: *Methods Mol. Biol.*, 2013: pp. 15–31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7\_2.
- [62] E.J. Tomotani, M. Vitolo, Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin, *Process Biochem.* 41 (2006) 1325–1331. doi:10.1016/j.procbio.2006.01.004.
- [63] H. Dong, Y. Li, G. Sheng, L. Hu, The study on effective immobilization of lipase on functionalized bentonites and their properties, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 95 (2013) 9–15. doi:10.1016/j.molcatb.2013.05.018.
- [64] M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimani, M.E. Sedaghat, Enzyme immobilization: Part 2 Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite, *Appl. Clay Sci.* 43 (2009) 308–316. doi:10.1016/j.clay.2008.09.011.
- [65] S. Cengiz, L. Çavaş, K. Yurdakoç, Bentonite and sepiolite as supporting media: Immobilization of catalase, *Appl. Clay Sci.* 65–66 (2012) 114–120. doi:10.1016/j.clay.2012.06.004.
- [66] M.E. Sedaghat, M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimani-Zad, Enzyme immobilization. Part 3, *Appl. Clay Sci.* 46 (2009) 125–130. doi:10.1016/j.clay.2009.07.023.
- [67] J. Lalonde, A. Margolin, Immobilization of enzymes, 2008. doi:10.1002/9783527618262.ch6.
- [68] E. Górecka, M. Jastrzebska, Immobilization techniques and biopolymer carriers, *Biotechnol. Food Sci.* 75 (2011) 65–86.
- [69] J. b Křenková, F. Foret, Immobilized microfluidic enzymatic reactors, *Electrophoresis.* 25 (2004) 3550–3563. doi:10.1002/elps.200406096.
- [70] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947602594&partnerID=40&md5=fe827afa9c1f8e7a9259e0a770543389>.
- [71] W.S. Adriano, D.B. Mendonça, D.S. Rodrigues, E.J. Mammarella, R.L.C. Giordano, Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin, *Biomacromolecules.* 9 (2008) 2170–2179.
- [72] C. Mateo, V. Grazú, B.C.C. Pessela, T. Montes, J.M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization., *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1593–601. doi:10.1042/BST0351593.
- [73] S.P. Brocklebank, R.K. Mitra, J.M. Woodley, M.D. Lilly, Carbon-Carbon Bond Synthesis., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 799 (1996) 729–736. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb33282.x.
- [74] M.J. Hernaiz, D.H.G. Crout, Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. Circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme Microb. Technol.* 27

- (2000). doi:10.1016/S0141-0229(00)00150-2.
- [75] D. Alagöz, S.S. Tükel, D. Yildirim, Purification, immobilization and characterization of (R)-hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus turcomanica* seeds and their applicability for synthesis of enantiopure cyanohydrins, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101 (2014) 40–46. doi:10.1016/j.molcatb.2013.12.019.
  - [76] F.A. Erhardt, H.-J. Jördening, Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*., *J. Biotechnol.* 131 (2007) 440–7. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.946.
  - [77] A. Pišvejcová, C. Rossi, L. Hušáková, V. Křen, S. Riva, D. Monti,  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase-catalyzed glycosylation of sugar derivatives: Modulation of the enzyme activity by  $\alpha$ -lactalbumin, immobilization and solvent tolerance, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 39 (2006) 98–104. doi:10.1016/j.molcatb.2006.01.013.
  - [78] N. Bortone, M. Fidaleo, M. Moresi, Internal and external mass transfer limitations on the activity of immobilised acid urease derivatives differing in enzyme loading, *Biochem. Eng. J.* 82 (2014) 22–33. doi:10.1016/j.bej.2013.10.017.
  - [79] L. Lloret, F. Hollmann, G. Eibes, G. Feijoo, M.T. Moreira, J.M. Lema, Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor., *Biodegradation.* 23 (2012) 373–86. doi:10.1007/s10532-011-9516-7.
  - [80] S. Seyhan Tükel, D. Alagöz, Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose, *Food Chem.* 111 (2008) 658–662. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.035.
  - [81] P. González-Pombo, L. Fariña, F. Carrau, F. Batista-Viera, B.M. Brena, A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine, *Process Biochem.* 46 (2011) 385–389. doi:10.1016/j.procbio.2010.07.016.
  - [82] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10 (2000) 157–176. doi:10.1016/S1381-1177(00)00124-7.
  - [83] K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds, *J. Ferment. Bioeng.* 71 (1991) 100–105. doi:10.1016/0922-338X(91)90231-5.
  - [84] A.F.S.A. Habeeb, R. Hiramoto, Reaction of proteins with glutaraldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.* 126 (1968) 16–26. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0014310023&partnerID=40&md5=3c759e1a819dbf9a83aa81c104409f41>.
  - [85] R. Fernandez-Lafuente, C.M. Rosell, V. Rodriguez, J.M. Guisan, Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 517–523. doi:10.1016/0141-0229(94)00090-E.
  - [86] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques.* 37 (2004).
  - [87] H.J.. Chae, M.-J.. In, E.Y.. Kim, Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde, *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 73 (1998) 195–204. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0000055183&partnerID=40&md5=d4bb720705908a6690db9f62ec110ef8>.

- [88] A.A. b Mendes, R.C.. Giordano, R.D.L.C.. Giordano, H.F.. De Castro, Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 68 (2011) 109–115. doi:10.1016/j.molcatb.2010.10.002.
- [89] D. Brady, J. Jordaan, *Advances in enzyme immobilisation*, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1639–1650. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70350257632&partnerID=40&md5=072b0fd0b1c701bc9de521f385cb2f37>.
- [90] D. Bagal, M.S. Karve, Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose–guar gum biopolymer membrane, *Anal. Chim. Acta.* 555 (2006) 316–321. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.010>.
- [91] M.. b Rhazi, J.. c Desbrières, A.. b c Tolaimate, A.. Alagui, P.. Vottero, Investigation of different natural sources of chitin: Influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan, *Polym. Int.* 49 (2000) 337–344. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0347738921&partnerID=40&md5=5707e2d5b87da2f51f78576362debfef>.
- [92] J.. b Ondruschka, M.. Trutnau, T.. Bley, Extraction and potential of the biopolymer chitosan [Gewinnung und potenzielle des biopolymers chitosan], *Chemie-Ingenieur-Technik.* 80 (2008) 811–820. doi:10.1002/cite.200800038.
- [93] S.Y.. Park, K.S.. Marsh, J.W.. Rhim, Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents, *J. Food Sci.* 67 (2002) 194–197. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036186088&partnerID=40&md5=10585f7c5bc0505873a5448ba4d4cd1b>.
- [94] K.P. Park, J.W., Choi, K.H., Park, Acid-base equilibria and related properties of chitosan, *Bull Korean Chem So.* 4 (1983) 68–72.
- [95] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 35–52. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00160-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00160-7).
- [96] N. Jaiswal, V.P. Pandey, U.N. Dwivedi, Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 288–295. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.079.
- [97] R. Mahajan, V.K. Gupta, J. Sharma, Comparison and suitability of gel matrix for entrapping higher content of enzymes for commercial applications, *Indian J. Pharm. Sci.* 72 (2010) 223–228. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954847667&partnerID=40&md5=96dbc1411892c3bdcd838391392a6b31>.
- [98] A. Nussinovitch, Bead Formation, Strengthening, and Modification, in: *Polym. Macro- Micro-Gel Beads Fundam. Appl. SE - 2*, Springer New York, 2010: pp. 27–52. doi:10.1007/978-1-4419-6618-6\_2.
- [99] R.A. Swaroopa, J. Annopurna, S. V Ramakrishna, Penicillin production in continuous stirred tank reactor by penicillium chrysogenum immobilized in agar, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 17 (2003) 119–122. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037972500&partnerID=40&md5=6cbf398d6beb860eab31c052337f10f7>.
- [100] O. Prakash, N. Jaiswal, Immobilization of a Thermostable alpha-Amylase on Agarose and Agar

Matrices and its Application in Starch Stain Removal, *World Appl. Sci. J.* 13 (2011) 572–577.

- [101] H. Cabana, J.P. Jones, S.N. Agathos, Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals., *J. Biotechnol.* 132 (2007) 23–31. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.948.
- [102] L. Cao, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Org. Lett.* 2 (2000) 1361–1364.
- [103] R.A. Sheldon, R. Schoevaart, L.M. Van Langen, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review), *Biocatal. Biotransformation.* 23 (2005) 141–147. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-28244452921&partnerID=40&md5=f2de99fb020501c7a1c8e4b6d017a6d5>.
- [104] A. Cerdobbel, K. De Winter, T. Desmet, W. Soetaert, Sucrose phosphorylase as cross-linked enzyme aggregate: Improved thermal stability for industrial applications, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1192–1197. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78349258236&partnerID=40&md5=e070f3a1d17c93c4bf4b68bb6cfe98d9>.
- [105] R. Schoevaart, M.W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A.P.G. Kieboom, F. Van Rantwijk, L.A.M. Van Der Wielen, R.A. Sheldon, Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 754–762. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4644232857&partnerID=40&md5=033609c924974ebb06a9e50098410473>.
- [106] J.D. Cui, S.R. Jia, Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges, *Crit. Rev. Biotechnol.* (2013) 1–14. doi:10.3109/07388551.2013.795516.
- [107] A. Arsenault, H. Cabana, J.P. Jones, Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent., *Enzyme Res.* 2011 (2011) 376015. doi:10.4061/2011/376015.
- [108] M. Wang, W. Qi, C. Jia, Y. Ren, R. Su, Z. He, Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 30–38. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.002>.
- [109] L. Wilson, A. Illanes, B.C.C. Pessela, O. Abian, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisan, Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media, *Biotechnol. Bioeng.* 86 (2004) 558–562.
- [110] H. Cabana, J.P. Jones, S.N. Agathos, Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals., *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 1582–92. doi:10.1002/bit.22198.
- [111] S. Talekar, A. Joshi, G. Joshi, P. Kamat, R. Haripurkar, S. Kambale, Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs), *RSC Adv.* 3 (2013) 12485. doi:10.1039/c3ra40818c.
- [112] M.I. García-García, A. Sola-Carvajal, G. Sánchez-Carrón, F. García-Carmona, A. Sánchez-Ferrer, New stabilized FastPrep-CLEAs for sialic acid synthesis., *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6186–91. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.026.
- [113] S. Shah, A. Sharma, M.N. Gupta, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Anal. Biochem.* 351 (2006) 207–213.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.028>.

- [114] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity, *Biochem. Eng. J.* 90 (2014) 36–43. doi:10.1016/j.bej.2014.05.004.
- [115] D.-H. Jung, J.-H. Jung, D.-H. Seo, S.-J. Ha, D.-K. Kweon, C.-S. Park, One-pot bioconversion of sucrose to trehalose using enzymatic sequential reactions in combined cross-linked enzyme aggregates, *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 801–804. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84873999847&partnerID=40&md5=78db8ed9e39ab2157bd06292c715eea1>.
- [116] C. Ning, E. Su, Y. Tian, D. Wei, Combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) for efficient integration of a ketoreductase and a cofactor regeneration system., *J. Biotechnol.* 184 (2014) 7–10. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.004.
- [117] S. Dalal, M. Kapoor, M.N. Gupta, Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 44 (2007) 128–132. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846489558&partnerID=40&md5=7e2f7997712675979775efae04e229c7>.
- [118] S. Ba, L. Haroune, C. Cruz-Morató, C. Jacquet, I.E. Touahar, J.-P. Bellenger, C.Y. Legault, J.P. Jones, H. Cabana, Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters., *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 748–755. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.004.
- [119] D. Brady, J. Jordaan, C. Simpson, A. Chetty, C. Arumugam, F.S. Moolman, Spherezymes: a novel structured self-immobilisation enzyme technology., *BMC Biotechnol.* 8 (2008) 8. doi:10.1186/1472-6750-8-8.
- [120] S. Talekar, V. Ghodake, T. Ghotage, P. Rathod, P. Deshmukh, S. Nadar, M. Mulla, M. Ladole, Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, *Bioresour. Technol.* 123 (2012) 542–547. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.044.
- [121] L.O. Wiemann, P. Weisshaupt, R. Nieguth, O. Thum, M.B. Ansorge-Schumacher, Enzyme Stabilization by Deposition of Silicone Coatings, *Org. Process Res. Dev.* 13 (2009) 617–620. doi:10.1021/op9000059.
- [122] A. Scholz, M. Eckstein, M.B. Ansorge-Schumacher, Hydrophilized Silicone Matrix for the Preparation of Stable Carbonyl Reductase Immobilizates, *ChemCatChem.* 5 (2013) 815–821. doi:10.1002/cctc.201200455.
- [123] U. Roessl, J. Nahálka, B. Nidetzky, Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 341–350. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77649336425&partnerID=40&md5=0cc497efaf255cad6643bd66bfa7f3c2>.
- [124] M.A. Zwerenz, H.-J. Jördening, Technisches Verfahren zur Gewinnung von Oligosacchariden, *Chemie Ing. Tech.* 82 (2010) 1490–1490. doi:10.1002/cite.201050034.
- [125] P.A. Srere, B. Mattiasson, K. Mosbach, An immobilized three enzyme system: A model for microenvironmental compartmentation in mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 2534–2538. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347330758&partnerID=40&md5=5b2f941200955a20432477e1daa99b20>.
- [126] L. Zhang, J. Shi, Z. Jiang, Y. Jiang, S. Qiao, J. Li, R. Wang, R. Meng, Y. Zhu, Y. Zheng, Bioinspired

- preparation of polydopamine microcapsule for multienzyme system construction, *Green Chem.* 13 (2011) 300–306. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79751518964&partnerID=40&md5=16baffd288db620504fcfbbea177eb08>.
- [127] H. Bäumlér, R. Georgieva, Coupled enzyme reactions in multicompartment microparticles, *Biomacromolecules*. 11 (2010) 1480–1487. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954587918&partnerID=40&md5=cbe6daad0b54ca12aa4d8d39f44d7ba1>.
- [128] O. Kreft, M. Prevot, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov, Shell-in-shell microcapsules: A novel tool for integrated, spatially confined enzymatic reactions, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 5605–5608. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547191063&partnerID=40&md5=91c994d5060dfe2ba29d534660469f45>.
- [129] J.M. Woodley, Choice of biocatalyst form for scalable processes, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 301–303. doi:10.1042/BST0340301.
- [130] E. Katchalski-Katzir, Immobilized enzymes — learning from past successes and failures, *Trends Biotechnol.* 11 (1993) 471–478. doi:10.1016/0167-7799(93)90080-S.
- [131] S.G. Burton, D.A. Cowan, J.M. Woodley, The search for the ideal biocatalyst, *Nat Biotech.* 20 (2002) 37–45. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0102-37>.
- [132] R. Xue, J.M. Woodley, Process technology for multi-enzymatic reaction systems., *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 183–95. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.033.
- [133] X. Xu, Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 289–304. doi:10.1002/ejlt.200390059.
- [134] I. Roy, M.N. Gupta, Use of Immobilized Biocatalysts in Fluidized Bed Format, in: J.M. Guisan (Ed.), *Immobil. Enzym. Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, 2006: pp. 311–319. doi:10.1007/978-1-59745-053-9\_27.
- [135] A. Bódalo, J.L. Gómez, E. Gómez, J. Bastida, M.F. Máximo, Fluidized bed reactors operating with immobilized enzyme systems: Design model and its experimental verification, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 915–922. doi:10.1016/0141-0229(94)00125-B.
- [136] P. Tufvesson, W. Fu, J.S. Jensen, J.M. Woodley, Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis, *Food Bioprod. Process.* 88 (2010) 3–11. doi:10.1016/j.fbp.2010.01.003.
- [137] J. Woodley, M.D. Lilly, Biotransformation reactor selection and operation, in: J.M.S. Cabral, D. Best, L. Boross, J. Tramper (Eds.), *Appl. Biocatal.*, Harwood Academic, 1994: pp. 371–393.
- [138] J.M. Woodley, M. Bisschops, A.J.J. Straathof, M. Ottens, Future directions for in-situ product removal (ISPR), *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 121–123. doi:10.1002/jctb.1790.
- [139] T. Waluga, S. Scholl, Process Design Aspects for Reaction-Integrated Adsorption in Multi-Enzymatic Catalysis\*, *Chem. Eng. Technol.* 38 (2015) 1817–1826. doi:10.1002/ceat.201500166.
- [140] G.J. Lye, J.M. Woodley, Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 395–402. doi:10.1016/S0167-7799(99)01351-7.
- [141] A. Freeman, J.M. Woodley, M.D. Lilly, In situ product removal as a tool for bioprocessing, *Nat. Biotechnol.* 11 (1993) 1007–1012. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-15744378134&partnerID=tZOTx3y1>.

- [142] M. García-García, I. Martínez-Martínez, A. Sánchez-Ferrer, F. García-Carmona, Production of the apoptotic cellular mediator 4-Methylthio-2-oxobutyric acid by using an enzymatic stirred tank reactor with in situ product removal., *Biotechnol. Prog.* 24 (2008) 187–91. doi:10.1021/bp0702424.
- [143] Y. Zhang, D. Wei, D. Li, S. Liu, Q. Song, Optimisation of enzymatic synthesis of cefaclor with in situ product removal and continuous acyl donor feeding, *Biocatal. Biotransformation*. 25 (2007) 59–64. doi:10.1080/10242420601141762.
- [144] S. Berensmeier, K. Buchholz, Separation of isomaltose from high sugar concentrated enzyme reaction mixture by dealuminated  $\beta$ -zeolite, *Sep. Purif. Technol.* 38 (2004) 129–138. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2942623748&partnerID=40&md5=5a429b287595599a111f631f46f20aee>.
- [145] Y. Sun, Y.L. Li, S. Bai, Z.D. Hu, Modeling and simulation of an in situ product removal process for lactic acid production in an airlift bioreactor, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 3290–3295. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032829698&partnerID=tZOtx3y1>.
- [146] M.J. Rodríguez-Alonso, F. Rodríguez-Vico, F.J. Las Heras-Vázquez, J.M. Clemente-Jiménez, Immobilization of a multi-enzyme system for L-amino acids production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016). doi:10.1002/jctb.4787.
- [147] J.-O. Lee, J.-K. Yi, S.-G. Lee, S. Takahashi, B.-G. Kim, Production of N-acetylneuraminic acid from N-acetylglucosamine and pyruvate using recombinant human renin binding protein and sialic acid aldolase in one pot, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 121–125. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.10.020.
- [148] J.H. Schrittwieser, I. Lavandera, B. Seisser, B. Mautner, J.H. Lutje Spelberg, W. Kroutil, Shifting the equilibrium of a biocatalytic cascade synthesis to enantiopure epoxides using anion exchangers, *Tetrahedron: Asymmetry*. 20 (2009) 483–488. doi:10.1016/j.tetasy.2009.02.035.
- [149] C.-W. Fan, G.-C. Xu, B.-D. Ma, Y.-P. Bai, J. Zhang, J.-H. Xu, A novel d-mandelate dehydrogenase used in three-enzyme cascade reaction for highly efficient synthesis of non-natural chiral amino acids., *J. Biotechnol.* 195C (2014) 67–71. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.10.026.
- [150] Y. Guo, J. Fang, T. Li, X. Li, C. Ma, X. Wang, P.G. Wang, L. Li, Comparing substrate specificity of two UDP-sugar Pyrophosphorylases and Efficient One-pot Enzymatic Synthesis of UDP-GlcA and UDP-GalA, *Carbohydr. Res.* 411 (2015) 1–5. doi:10.1016/j.carres.2015.04.001.
- [151] N. Iwai, Y. Kitahara, T. Kitazume, One-pot three-step continuous enzymatic synthesis of 5-fluoro-5-deoxy-d-ribose, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 73 (2011) 1–4. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.018.
- [152] Y. Zou, M. Xue, W. Wang, L. Cai, L. Chen, J. Liu, P.G. Wang, J. Shen, M. Chen, One-pot three-enzyme synthesis of UDP-Glc, UDP-Gal, and their derivatives, *Carbohydr. Res.* 373 (2013) 76–81. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.005.
- [153] F.A. Erhardt, S. Stammen, H.-J. Jördening, Production, characterization and (co-)immobilization of dextranase from *Penicillium aculeatum*., *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1069–73. doi:10.1007/s10529-008-9659-8.
- [154] J.M. Woodley, N.J. Titchener-Hooker, The use of windows of operation as a bioprocess design tool, *Bioprocess Eng.* 14 (1996) 263. doi:10.1007/s004490050215.
- [155] K. Siebertz, D. van Bebber, T. Hochkirchen, *Statistische Versuchsplanung*, Springer Berlin

Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010. doi:10.1007/978-3-642-05493-8.

- [156] C.-F. Mandenius, A. Brundin, Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology, *Biotechnol. Prog.* 24 (2008). doi:10.1002/btpr.67.
- [157] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, 5th ed., John Wiley, New York, 2001.
- [158] D. Baş, İ.H. Boyacı, Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *J. Food Eng.* 78 (2007) 836–845. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- [159] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*. 76 (2008) 965–977. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [160] C.Z. Guidini, J. Fischer, L.N.S. Santana, V.L. Cardoso, E.J. Ribeiro, Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, *Biochem. Eng. J.* 52 (2010) 137–143. doi:10.1016/j.bej.2010.07.013.
- [161] Y. Jeung Cho, J. Sinha, J. Pil Park, J. Won Yun, Production of inulooligosaccharides from inulin by a dual endoinulinase system, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001) 428–433. doi:10.1016/S0141-0229(01)00414-8.
- [162] M. Andersson, P. Adlercreutz, Evaluation of simple enzyme kinetics by response surface modelling, *Biotechnol. Tech.* 13 (1999) 903–907. doi:10.1023/A:1008994613645.
- [163] W. Huang, H. Niu, Z. Li, L. Li, W. Wang, Ellagic acid from acorn fringe by enzymatic hydrolysis and combined effects of operational variables and enzymes on yield of the production., *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1518–25. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.026.
- [164] A. Rosenthal, D.. Pyle, K. Niranjana, S. Gilmour, L. Trinca, Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 499–509. doi:10.1016/S0141-0229(00)00351-3.
- [165] E. Rosales, M.A. Sanromán, M. Pazos, Application of central composite face-centered design and response surface methodology for the optimization of electro-Fenton decolorization of Azure B dye, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 1738–1746. doi:10.1007/s11356-011-0668-0.
- [166] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. da Silva, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. de Andrade, M.C. Breitzkreitz, I.C.S.F. Jardim, B.B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A*. 1158 (2007) 2–14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051.
- [167] K.S. Prasad, C.S. Rao, D.N. Rao, Application of design of experiments to plasma Arc Welding Process: a review, *J. Brazilian Soc. Mech. Sci. Eng.* 34 (2012) 75–81. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1678-58782012000100010&nrm=iso.
- [168] A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2008. doi:10.1007/978-1-4020-8361-7.
- [169] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics: principles and methods*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [170] A. Chmiel, L. Liese, M. Hilterhaus, Howaldt, *Enzymkinetik*, in: Horst, Chmiel (Eds.), *Bioprozesstechnik*, Spektrum Akademischer Verlag, 2011.



- [171] A.M. Dehkordi, I. Safari, M.M. Karima, Experimental and modeling study of catalytic reaction of glucose isomerization: Kinetics and packed-bed dynamic modeling, *AIChE J.* 54 (2008) 1333–1343. doi:10.1002/aic.11460.
- [172] A. Rogers, Y. Gibon, Enzyme kinetics: theory and practice, in: *Plant Metab. Networks*, Springer, 2009: pp. 71–103.
- [173] H. Bisswanger, *Enzyme : Struktur, Kinetik und Anwendungen*, Hoboken, Wiley-VCH, 2015.
- [174] V.G. Grigorenko, I.P. Andreeva, M.Y. Rubtsova, I.M. Deygen, R.L. Antipin, A.G. Majouga, A.M. Egorov, D.A. Beshnova, J. Kallio, C. Hackenberg, V.S. Lamzin, Novel non- $\beta$ -lactam inhibitor of  $\beta$ -lactamase TEM-171 based on acylated phenoxyaniline, *Biochimie.* 132 (2017) 45–53. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.011.
- [175] A. Hara, S. Endo, T. Matsunaga, M. Soda, O. El-Kabbani, K. Yashiro, Inhibition of aldo-keto reductase family 1 member {B10} by unsaturated fatty acids, *Arch. Biochem. Biophys.* 609 (2016) 69–76. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.010.
- [176] A.S.. Chintakrindi, E.A.F.. Martis, D.J.. Gohil, S.T.. Kothari, A.S.. Chowdhary, E.C.. Coutinho, M.A.. Kanyalkar, A computational model for docking of noncompetitive neuraminidase inhibitors and probing their binding interactions with neuraminidase of influenza virus H5N1, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 12 (2016) 272–281. doi:10.2174/1573409912666160713111242.
- [177] N. Singh, D. Bhattacharyya, Cholesterol and Its Derivatives Reversibly Inhibit Proteinase K, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 596–609. doi:10.1002/jcp.25457.
- [178] Á.G. Díaz-Sánchez, E. Alvarez-Parrilla, A. Martínez-Martínez, L. Aguirre-Reyes, J.A. Orozpe-Olvera, M.A. Ramos-Soto, A.J. Núñez-Gastélum, B. Alvarado-Tenorio, L.A. De La Rosa, Inhibition of urease by disulfiram, an FDA-approved thiol reagent used in humans, *Molecules.* 21 (2016). doi:10.3390/molecules21121628.
- [179] B. Sun, F. Hartl, K. Castiglione, D. Weuster-Botz, Dynamic mechanistic modeling of the multienzymatic one-pot reduction of dehydrocholic acid to 12-keto ursodeoxycholic acid with competing substrates and cofactors., *Biotechnol. Prog.* 31 (2015) 375–86. doi:10.1002/btpr.2036.
- [180] S. Goswami, N. Gupta, S. Datta, Using the  $\beta$ -glucosidase catalyzed reaction product glucose to improve the ionic liquid tolerance of  $\beta$ -glucosidases, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016). doi:10.1186/s13068-016-0484-3.
- [181] Y.-H.. Hu, X.. Liu, Y.-L.. Jia, Y.-J.. Guo, Q.. Wang, Q.-X.. b Chen, Inhibitory kinetics of chlorocinnamic acids on mushroom tyrosinase, *J. Biosci. Bioeng.* 117 (2014) 142–146. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.07.002.
- [182] W.W. Cleland, The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations, *BBA - Biochim. Biophys. Acta.* 67 (1963) 104–137. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50549159930&partnerID=40&md5=9d2c8adbd31efb37920b4ef982ba9926>.
- [183] E.L. King, C. Altman, A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1375–1378. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33947472850&partnerID=40&md5=9ce63651567557290d80579fd86e3a04>.
- [184] D.L. Regan, P. Dunnill, M.D. Lilly, Immobilized enzyme reaction stability: Attrition of the support

- material, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 333–343. doi:10.1002/bit.260160304.
- [185] Y. Liu, M. Nishimoto, M. Kitaoka, Facile enzymatic synthesis of sugar 1-phosphates as substrates for phosphorylases using anomeric kinases, *Carbohydr. Res.* 401 (2015) 1–4. doi:10.1016/j.carres.2014.10.014.
  - [186] R. Silverstein, J. Voet, D. Reed, R.H. Abeles, Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase., *J. Biol. Chem.* 242 (1967).
  - [187] M. Doudoroff, H.A. Barker, W.Z. Hassid, Studies with bacterial sucrose phosphorylase; the mechanism of action of sucrose phosphorylase as a glucose-transferring enzyme (transglucosidase), *J. Biol. Chem.* 168 (1947).
  - [188] T. Koga, K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, M. Kikuchi, Purification and Some Properties of Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 1805–1810.
  - [189] K. De Winter, W. Soetaert, T. Desmet, An Imprinted Cross-Linked Enzyme Aggregate (iCLEA) of Sucrose Phosphorylase: Combining Improved Stability with Altered Specificity., *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 11333–42. doi:10.3390/ijms130911333.
  - [190] A. Schwarz, B. Nidetzky, Asp-196-->Ala mutant of *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase exhibits altered stereochemical course and kinetic mechanism of glucosyl transfer to and from phosphate., *FEBS Lett.* 580 (2006) 3905–10. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.020.
  - [191] J.J. Mieyal, M. Simon, R.H. Abeles, Mechanism of action of sucrose phosphorylase. 3. The reaction with water and other alcohols., *J. Biol. Chem.* 247 (1972).
  - [192] A. Guibert, P. Monsan, Production and purification of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. Application to the production of glucose-1-phosphate, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 542 (1989) 307–311.
  - [193] C. Goedl, A. Schwarz, A. Minani, B. Nidetzky, Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of alpha-D-glucose 1-phosphate., *J. Biotechnol.* 129 (2007) 77–86. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.019.
  - [194] H. Pang, L. Du, J. Pei, Y. Wei, Q. Du, R. Huang, Sucrose Hydrolytic Enzymes: Old Enzymes for New Uses as Biocatalysts for Medical Applications, *Curr. Top. Med. Chem.* 13 (2013) 1234–1241. doi:10.2174/15680266113139990010.
  - [195] C. Luley-Goedl, B. Nidetzky, Carbohydrate synthesis by disaccharide phosphorylases: Reactions, catalytic mechanisms and application in the glycosciences, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1324–1338.
  - [196] D.. Sprogøe, L.A.M.. Van Den Broek, O.. Mirza, J.S.. Kastrup, A.G.J.. Voragen, M.. Gajhede, L.K.. Skov, Crystal Structure of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*, *Biochemistry.* 43 (2004) 1156–1162. doi:10.1021/bi0356395.
  - [197] A. Schwarz, L. Brecker, B. Nidetzky, Acid-base catalysis in *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase probed by site-directed mutagenesis and detailed kinetic comparison of wild-type and Glu237-->Gln mutant enzymes., *Biochem. J.* 403 (2007) 441–9. doi:10.1042/BJ20070042.
  - [198] C. Goedl, B. Nidetzky, Sucrose phosphorylase harbouring a redesigned, glycosyltransferase-like

- active site exhibits retaining glucosyl transfer in the absence of a covalent intermediate., *Chembiochem.* 10 (2009) 2333–7. doi:10.1002/cbic.200900429.
- [199] C. Luley-Goedl, T. Sawangwan, M. Mueller, A. Schwarz, B. Nidetzky, Biocatalytic process for production of  $\alpha$ -glucosylglycerol using sucrose phosphorylase, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (2010) 276–283.
- [200] F. Taylor, L. Chen, C.S. Gong, G.T. Tsao, Kinetics of immobilized sucrose phosphorylase, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 317–328. doi:10.1002/bit.260240206.
- [201] A. Cerdobbel, T. Desmet, K. De Winter, J. Maertens, W. Soetaert, Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent immobilization., *J. Biotechnol.* 150 (2010) 125–30. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.029.
- [202] L.R. Maréchal, S.H. Goldemberg, Laminaribiose phosphorylase from *euglena gracilis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13 (1963) 106–109.
- [203] M. Kitaoka, T. Sasaki, H. Taniguchi, Purification and Properties of Laminaribiose Phosphorylase (EC 2.4. 1.31) from *Euglena gracilis* Z, *Arch. Biochem. Biophys.* 304 (1993) 508–514. doi:http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1993.1383.
- [204] D.J. Manners, D.C. Taylor, Studies on carbohydrate metabolizing enzymes: XVI. Specificity of laminaribiose phosphorylase from *Astasia ocellata*, *Arch. Biochem. Biophys.* 121 (1967) 443–451. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(67)90099-9.
- [205] L.R. Maréchal,  $\beta$ -1,3-oligoglucan: Orthophosphate glucosyltransferases from *Euglena gracilis*. I. Isolation and some properties of a  $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase, *BBA - Enzymol.* 146 (1967) 417–430.
- [206] M. Kitaoka, K. Matsuoka, Yasuyukiori, M. Nishimoto, K. Hayashi, Characterization of a Bacterial Laminaribiose Phosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 343–348.
- [207] T.. Nihira, Y.. Saito, M.. Kitaoka, M.. Nishimoto, K.. Otsubo, H.. Nakai, Characterization of a laminaribiose phosphorylase from *Acholeplasma laidlawii* PG-8A and production of 1,3- $\beta$ -d-glucosyl disaccharides, *Carbohydr. Res.* 361 (2012) 49–54. doi:10.1016/j.carres.2012.08.006.
- [208] M. Kitaoka, Diversity of phosphorylases in glycoside hydrolase families., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015). doi:10.1007/s00253-015-6927-0.
- [209] S.H. Goldemberg, L.R. Marechal, B.C. De Souza,  $\beta$ -1,3-Oligoglucan:Orthophosphate Glucosyltransferase from *Euglena gracilis*, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 45–50. http://www.jbc.org/cgi/content/long/241/1/45 (accessed September 12, 2013).
- [210] Y. Ogawa, K. Noda, S. Kimura, M. Kitaoka, M. Wada, Facile preparation of highly crystalline lamellae of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan using an extract of *Euglena gracilis*., *Int. J. Biol. Macromol.* 64 (2014) 415–9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.12.027.
- [211] M. Kitaoka, T. Sasaki, H. Taniguchi, Synthesis of laminarioligosaccharides using crude extract of *Euglena gracilis* z cells, *Agric. Biol. Chem.* 5 (1991) 1431–1432.
- [212] S.H. Bhosale, M.B. Rao, V. V Deshpande, Molecular and industrial aspects of glucose isomerase, *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 280–300. http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029998291&partnerID=40&md5=2bd434c25d5d6e04e611b9b3ca7eb086.
- [213] H. Karaoglu, D. Yanmis, F.A. Sal, A. Celik, S. Canakci, A.O. Belduz, Biochemical characterization

- of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2T that displays a high level of activity and thermal stability, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97 (2013) 215–224. doi:10.1016/j.molcatb.2013.08.019.
- [214] C.R. Silva, T.C. Zangirolami, J.P. Rodrigues, K. Matugi, R.C. Giordano, R.L.C. Giordano, An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor., *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 35–42. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.09.005.
- [215] I. De Bari, D. Cuna, V. Di Matteo, F. Liuzzi, Bioethanol production from steam-pretreated corn stover through an isomerase mediated process, *N. Biotechnol.* 31 (2014) 185–195. doi:10.1016/j.nbt.2013.12.003.
- [216] K.P. Miller, Y.K. Gowtham, J.M. Henson, S.W. Harcum, Xylose isomerase improves growth and ethanol production rates from biomass sugars for both *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Prog.* 28 (2012) 669–680. doi:10.1002/btpr.1535.
- [217] C.S. Gong, L.F. Chen, M.C. Flickinger, Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 430–436. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0019432222&partnerID=40&md5=eb737eed867124a2c406a22c45a7ac26>.
- [218] H. Rasmussen, T. la Cour, J. Nyborg, M. Schülein, Structure determination of glucose isomerase from *Streptomyces murinus* at 2.6 Å resolution, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 50 (1994) 124–131. doi:10.1107/S09074444993009540.
- [219] M. Garcia-Viloca, C. Alhambra, D.G. Truhlar, J. Gao, c, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 7268–7269. doi:10.1021/ja026383d.
- [220] G.N. Roman, N.B. Jansen, H.-Y. Hsiao, G.T. Tsao, Kinetic studies of the enzymatic isomerization of xylose, *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 129–133. doi:10.1016/0141-0229(85)90143-7.
- [221] Y.H. Park, T.W. Chung, M.H. Han, Studies on microbial glucose isomerase: 4. Characteristics of immobilized whole-cell glucose isomerase from *Streptomyces* spp., *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 227–233. doi:10.1016/0141-0229(80)90052-6.
- [222] O.B. Jørgensen, L.G. Karlsen, N.B. Nielsen, S. Pedersen, S. Rugh, A New Immobilized Glucose Isomerase with High Productivity Produced by a Strain of *Streptomyces murinus*, *Starch - Stärke.* 40 (1988) 307–313. doi:10.1002/star.19880400809.
- [223] C. Müller, D. Hartig, K. Vorländer, A.-C. Sass, S. Scholl, H.-J. Jördening, Chitosan-based hybrid immobilization in bienzymatic reactions and its application to the production of laminaribiose, *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2017). doi:10.1007/s00449-017-1797-8.
- [224] U. Pruße, B. Fox, M. Kirchhoff, F. Bruske, J. Breford, K.-D. Vorlop, The Jet Cutting Method as a new immobilization technique, *Biotechnol. Tech.* 12 (1998) 105–108. doi:10.1023/A:1008828214839.
- [225] P. Torres, F. Batista-Viera, Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 83 (2012) 57–64. doi:10.1016/j.molcatb.2012.07.004.
- [226] C. Mateo, O. Abian, G. Fernández-Lorente, J. Pedroche, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisan, Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 629–634. doi:10.1021/bp010171n.

- [227] P. Torres, F. Batista-Viera, Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74 (2012) 230–235. doi:10.1016/j.molcatb.2011.11.006.
- [228] P. D'Arrigo, C. Allegretti, A. Fiorati, L. Piubelli, E. Rosini, D. Tessaro, M. Valentino, L. Pollegioni, Immobilization of *Aspartate* oxidase from *Sulfolobus tokodaii* as a biocatalyst for resolution of aspartate solutions, *Catal. Sci. Technol.* 5 (2015) 1106–1114. doi:10.1039/C4CY00968A.
- [229] C. Müller, T. Ortmann, A. Abi, D. Hartig, S. Scholl, H.-J. Jördening, Immobilization and Characterization of *E. gracilis* Extract with Enriched Laminaribiose Phosphorylase Activity for Biotransformation of Laminaribiose, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2016) 1–19. doi:10.1007/s12010-016-2320-4.
- [230] R. Weimberg, M. Doudoroff, Studies with three bacterial sucrose phosphorylases., *J. Bacteriol.* 68 (1954).
- [231] M. Zein, Integration of Reaction and Product purification for trienzymatic catalyzed synthesis of Laminaribiose from Sucrose, Technische Universität Braunschweig, 2014. doi:10.1002/cite.201300065.
- [232] Y. Takasaki, Kinetic and equilibrium studies on d-glucose-d-fructose isomerization catalyzed by glucose isomerase from *Streptomyces* sp., *Agric. Biol. Chem.* 31 (1967) 309–313. doi:10.1080/00021369.1967.10858809.
- [233] K. Vorländer, Trienzymatische Herstellung von Laminaribiose mit reaktionsintegrierter Adsorption, TU Braunschweig, 2016.
- [234] A. Lejeune, M. Vanhove, J. Lamotte-Brasseur, R.H. Pain, J.-M. Frère, A. Matagne, Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1  $\beta$ -lactamase, *Chem. Biol.* 8 (2001) 831–842. doi:10.1016/S1074-5521(01)00053-9.
- [235] K. De Winter, A. Cerdobbel, W. Soetaert, T. Desmet, Operational stability of immobilized sucrose phosphorylase: Continuous production of  $\alpha$ -glucose-1-phosphate at elevated temperatures, *Process Biochem.* 46 (2011) 2074–2078. doi:10.1016/j.procbio.2011.08.002.
- [236] M. Zein, Integration of Reaction and Product Purification for trienzymatic catalyzed synthesis of laminaribiose from sucrose, TU Braunschweig, 2015.
- [237] A.-C. Sass, Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von Saccharosephosphorylase in Chitosan-Beads, 2015.
- [238] S. Meyer, Charakterisierung der Stabilität und Aktivität von Enzymimmobilisaten in Phosphatpuffer, 2015.
- [239] H. No, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72. doi:10.1016/S0168-1605(01)00717-6.
- [240] T. Waluga, S. Scholl, Diffusion of Saccharides and Sugar Alcohol Sorbitol in Chitosan Membranes and Beads, *Chem. Eng. Technol.* 36 (2013) 681–686. doi:10.1002/ceat.201200522.
- [241] A. Kumar, P. Attri, P. Venkatesu, Effect of polyols on the native structure of  $\alpha$ -chymotrypsin: A comparable study, *Thermochim. Acta.* 536 (2012) 55–62. doi:10.1016/j.tca.2012.02.027.
- [242] S. James, J.J. McManus, Thermal and solution stability of lysozyme in the presence of sucrose,

- glucose, and trehalose., *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 10182–8. doi:10.1021/jp303898g.
- [243] D.R. Hall, M.P. Jacobsen, D.J. Winzor, Stabilizing effect of sucrose against irreversible denaturation of rabbit muscle lactate dehydrogenase, *Biophys. Chem.* 57 (1995) 47–54. doi:10.1016/0301-4622(95)00044-X.
- [244] Z. Onderková, J. Bryjak, K. Vaňková, M. Polakovič, Kinetics of thermal inactivation of free *Aureobasidium pullulans* fructosyltransferase, *Enzyme Microb. Technol.* 47 (2010) 134–139. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.06.009.
- [245] Z.H. Liu, W.N. Wu, Y. Liu, W. Qi, Z.M. He, Enhancing the thermostability of  $\beta$ -mannanase by protective additives, *Tianjin Daxue Xuebao (Ziran Kexue Yu Gongcheng Jishu Ban)/Journal Tianjin Univ. Sci. Technol.* 41 (2008) 114–118. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-40449104406&partnerID=tZOtx3y1>.
- [246] S. Rasouli, S. Hosseinkhani, P. Yaghmaei, A. Ebrahim-Habibi, Effects of sucrose and trehalose on stability, kinetic properties, and thermal aggregation of firefly luciferase., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (2011) 572–82. doi:10.1007/s12010-011-9276-1.
- [247] S. De Cordt, M. Hendrickx, G. Maesmans, P. Tobback, The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of  $\alpha$ -amylase, *Biotechnol. Bioeng.* 43 (1994) 107–114. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028098166&partnerID=tZOtx3y1>.
- [248] K. Samborska, Y. Guivarc'h, A. Van Loey, M. Hendrickx, The thermal stability of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase in presence of sugars and polyols, *J. Food Process Eng.* 29 (2006) 287–303. doi:10.1111/j.1745-4530.2006.00062.x.
- [249] A. Illanes, L. Wilson, L. Raiman, Design of immobilized enzyme reactors for the continuous production of fructose syrup from whey permeate, *Bioprocess Eng.* 21 (1999) 509–515. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0032763588&partnerID=40&md5=a71dea5288dd624aff51d62a08fa3723>.
- [250] T. Waluga, M. Zein, H.-J. Jördening, S. Scholl, Simulation der reaktionsintegrierten Adsorption von trienzymatisch produzierter Laminaribiose, *Chemie Ing. Tech.* 86 (2014) 119–128. doi:10.1002/cite.201300065.

## 9 Anhang

### 9.1 ANOVA SP- und LP-Sepabeads und GI-Granulat

Tabelle A 1 Varianzanalyse (ANOVA) der Modelle 2ter Ordnung (Antwortvariablen Y<sub>1</sub> Fructosekonzentration nach 10 min; Y<sub>2</sub> Glucosekonzentration nach 10 min) aus den Versuchsplänen zur Untersuchung der Einflüsse des pH-Wertes und der Molarität des Puffers sowie der Temperatur auf die Glucose- und Fructosebildung durch SP-Sepabeads.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	Prob > F	
Y <sub>1</sub> Fructosekonzentration 10 min						
Transformation	y' = ln(y+k)					
Modell	2,52	7	0,36	28,31	<0,0001	signifikant
A-pH	0,71	1	0,71	55,64	<0,0001	
B-Molarität	0,022	1	0,022	1,73	0,2208	
C-Temperatur	0,60	1	0,60	47,25	<0,0001	
AB	4,167E-03	1	4,167E-03	0,33	0,5812	
AC	0,064	1	0,064	5,00	0,0521	
A <sup>2</sup>	0,36	1	0,36	28,43	0,0005	
B <sup>2</sup>	0,19	1	0,19	15,12	0,0037	
Residual	0,11	9	0,013			
Lack of Fit	0,11	7	0,016	14,21	0,0673	nicht signifikant
Pure Error	2,258E-03	2	1,129E-03			
Cor Total	2,64	16				
Standard deviation	0,11					
Mean	0,74					
C.V. %	15,25					
R <sup>2</sup>	0,9566					
Adj. R <sup>2</sup>	0,9228					
Pred. R <sup>2</sup>	0,7330					
Adeq precision	16,658					
Y <sub>2</sub> Glucosekonzentration 10 min						
Transformation	keine					
Modell	0,35	7	0,049	47,69	<0,0001	signifikant
A-pH	0,14	1	0,14	134,43	<0,0001	
B-Molarität	0,09	1	0,087	84,35	<0,0001	
C-Temperatur	0,10	1	0,099	95,77	<0,0001	
AB	2,761E-03	1	2,761E-03	2,67	0,1366	
AC	0,01	1	0,010	9,86	0,0119	
A <sup>2</sup>	6,960E-03	1	6,960E-03	6,73	0,0290	
B <sup>2</sup>	1,557E-03	1	1,557E-03	1,51	0,2508	
Residual	9,302E-03	9	1,034E-03			
Lack of Fit	8,367E-03	7	1,195E-03	2,56	0,3098	nicht signifikant
Pure Error	9,351E-04	2	4,675E-04			
Cor Total	0,35	16				
Standard deviation	0,032					
Mean	0,431					

C.V. %	7,458					
R <sup>2</sup>	0,9737					
Adj. R <sup>2</sup>	0,9533					
Pred. R <sup>2</sup>	0,8294					
Adeq precision	28,179					

Die Übereinstimmung von predicted und adjusted R<sup>2</sup> ist in beiden Fällen angemessen. Adequate precision gibt das Signal zu Rauschverhältnis an. Ein Verhältnis größer als 4 ist erwünscht und wird in beiden Modellen erreicht, sie können also zur Navigation im Designraum genutzt werden.

**Tabelle A 2 Varianzanalyse (ANOVA) der Modelle 2ter Ordnung (Antwortvariablen Y<sub>1</sub> Laminaribiosekonzentration nach 30 min; Y<sub>2</sub> Laminaribiosekonzentration nach 60 min (2. Verwendung)) aus den Versuchsplänen zur Untersuchung der Einflüsse des pH-Wertes und der Molarität des Puffers sowie der Temperatur auf die Laminaribiosebildung durch LP-Sepabeads.**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	Prob > F	
Y <sub>1</sub> Laminaribiosekonzentration 30 min						
Transformation	None					
Model	38,57	9	4,29	110,93	<0,0001	signifikant
A-pH	27,68	1	27,68	716,60	<0,0001	
B-Molarität	0,14	1	0,14	3,64	0,0982	
C-Temperatur	0,83	1	0,83	21,43	0,0024	
AB	0,98	1	0,98	25,47	0,0015	
AC	0,03	1	0,03	0,78	0,4079	
BC	0,13	1	0,13	3,43	0,1063	
A <sup>2</sup>	3,24	1	3,24	83,79	<0,0001	
B <sup>2</sup>	1,68	1	1,68	43,51	0,0003	
C <sup>2</sup>	0,40	1	0,40	10,28	0,0149	
Residual	0,27	7	0,04			
Lack of Fit	0,23	5	0,05	2,13	0,3497	nicht signifikant
Pure Error	0,04	2	0,02			
Cor Total	38,84	16				
Standard deviation	0,20					
Mean	7,14					
C.V. %	2,75					
R <sup>2</sup>	0,9930					
Adj, R <sup>2</sup>	0,9841					
Pred, R <sup>2</sup>	0,9534					
Adeq precision	28,836					
Y <sub>2</sub> Laminaribiosekonzentration 60 min (2te Verwendung)						
Transformation	y' = √(y+k)					
Model	6,27	9	0,70	32,98	<0,0001	signifikant
A-pH	2,53	1	2,53	119,78	<0,0001	
B-Molarity	0,29	1	0,29	13,60	0,0078	
C-Temperature	0,86	1	0,86	40,50	0,0004	
AB	0,09	1	0,09	4,27	0,0777	
AC	0,16	1	0,16	7,51	0,0289	



BC	0,50	1	0,50	23,59	0,0018	
A <sup>2</sup>	0,50	1	0,50	23,67	0,0018	
B <sup>2</sup>	0,21	1	0,21	9,99	0,0159	
C <sup>2</sup>	0,014	1	0,01	0,68	0,4364	
Residual	0,15	7	0,021			
Lack of Fit	0,15	5	0,029	49,94	0,0197	signifikant
Pure Error	1,18E-03	2	5,877E-04			
Cor Total	6,42	16				
Standard deviation	0,15					
Mean	3,20					
C.V. %	4,54					
R <sup>2</sup>	0,9770					
Adj. R <sup>2</sup>	0,9473					
Pred. R <sup>2</sup>	0,8343					
Adeq precision	22,1276					

Die Übereinstimmung von predicted und adjusted R<sup>2</sup> ist in beiden Fällen angemessen. Adequate precision gibt das Signal zu Rauschverhältnis an. Ein Verhältnis größer als 4 ist erwünscht und wird in beiden Modellen erreicht, sie können also zur Navigation im Designraum genutzt werden.

Model Y<sub>2</sub> zeigt trotz eines hohen Regressionskoeffizienten einen signifikanten Lack of fit. Das wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die geringe Variabilität der wiederholten Experimente verursacht. Wiederholung aller Designpunkte und eine Erhöhung der Zentralpunktweiterholungen könnte das Problem beheben. Ein weiterer Grund für den signifikanten Lack of Fit und den verringerten Determination coefficient könnte der Einfluss der thermischen Inaktivierung der Enzyme sein, die nicht durch ein Modell zweiter Ordnung beschrieben werden kann.

**Tabelle A 3 Varianzanalyse (ANOVA) der Modelle 2ter Ordnung (Antwortvariablen Y<sub>1</sub> Glucosekonzentration nach 10 min; Y<sub>2</sub> Glucosekonzentration nach 60 min) aus den Versuchsplänen zur Untersuchung der Einflüsse des pH-Wertes und der Molarität des Puffers sowie der Temperatur auf die Glucosebildung durch GI-Granulat.**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	Prob > F	
Y <sub>1</sub> Glucosekonzentration 10 min						
Transformation	y' = 1/(y+k)					
Model	5,86E-03	9,00E+00	6,52E-04	3,33E+02	5,86E-03	signifikant
A-pH	2,52E-03	1,00E+00	2,52E-03	1,29E+03	2,52E-03	
B-Molarity	2,75E-04	1,00E+00	2,75E-04	1,40E+02	2,75E-04	
C-Temperature	2,62E-03	1,00E+00	2,62E-03	1,34E+03	2,62E-03	
AB	3,17E-04	1,00E+00	3,17E-04	1,62E+02	3,17E-04	
AC	5,20E-05	1,00E+00	5,20E-05	2,66E+01	5,20E-05	
BC	6,76E-06	1,00E+00	6,76E-06	3,45E+00	6,76E-06	
A <sup>2</sup>	6,42E-07	1,00E+00	6,42E-07	3,30E-01	6,42E-07	
B <sup>2</sup>	2,06E-05	1,00E+00	2,06E-05	1,05E+01	2,06E-05	
C <sup>2</sup>	1,56E-05	1,00E+00	1,56E-05	7,98E+00	1,56E-05	
Residual	1,37E-05	7,00E+00	1,96E-06		1,37E-05	
Lack of Fit	1,35E-05	5,00E+00	2,70E-06	2,60E+01	1,35E-05	signifikant
Pure Error	2,08E-07	2,00E+00	1,04E-07		2,08E-07	

Cor Total	5,88E-03	1,60E+01			5,88E-03	
Standard deviation	1,40E-03					
Mean	0,08					
C.V. %	1,72					
R <sup>2</sup>	0,9977					
Adj. R <sup>2</sup>	0,9947					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9785					
Adeq precision	69,744					
Y <sub>2</sub> Glucosekonzentration 60 min						
Transformation	keine					
Modell	3583,23	9	398,14	76,69	< 0,0001	signifikant
A-pH	961,13	1	961,13	185,13	< 0,0001	
B-Molarität	458,62	1	458,62	88,34	< 0,0001	
C-Temperatur	1852,65	1	1852,65	356,85	< 0,0001	
AB	126,19	1	126,19	24,31	0,0017	
AC	48,76	1	48,76	9,39	0,0182	
BC	29,59	1	29,59	5,7	0,0484	
A <sup>2</sup>	9,72	1	9,72	1,87	0,2135	
B <sup>2</sup>	12,84	1	12,84	2,47	0,1598	
C <sup>2</sup>	11,61	1	11,61	2,24	0,1785	
Residual	36,34	7	5,19			
Lack of Fit	36,29	5	7,26	270,07	0,0037	signifikant
Pure Error	0,054	2	0,027			
Cor Total	3619,57	16				
Standard deviation	2,28					
Mean	39,74					
C,V, %	5,73					
R <sup>2</sup>	0,9900					
Adj, R <sup>2</sup>	0,9771					
Pred, R <sup>2</sup>	0,8582					
Adeq precision	34,548					

Die Übereinstimmung von predicted und adjusted R<sup>2</sup> ist in beiden Fällen angemessen. Adequate precision gibt das Signal zu Rauschverhältnis an. Ein Verhältnis größer als 4 ist erwünscht und wird in beiden Modellen erreicht, sie können also zur Navigation im Designraum genutzt werden.

Beide Modelle zeigen trotz eines hohen Regressionskoeffizienten einen signifikanten Lack of fit. Das wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die geringe Variabilität der wiederholten Experimente verursacht. Wiederholung aller Designpunkte und eine Erhöhung der Zentralpunkt wiederholungen könnten das Problem beheben. Aufgrund der hohen Thermostabilität der Glucoseisomerase wird der Einfluss der thermischen Inaktivierung hier keine Rolle spielen.

## 9.2 Verwendete Matlab-Programme

Die im Folgenden aufgeführten Matlab-Programme beruhen im Ansatz auf dem Programm von Waluga [250] wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und erweitert (Änderung der Kinetiken, Einführung von Halbwertszeiten).

### 9.2.1 Funktion zur Modellierung eines Batch-Versuches

```
function dydt = Func_programBSTR (t,y)
global V LP SP vmaxLam vmaxLam3 KI1 KIG1P KIGlc KMG1P KMGlC KMLam
global KMP KMSac vmaxSuc-P vmaxSuc-H
% Festlegen der Parameterwerte
V=0.0018; %Reaktionsvolumen [L]
%Parameter der SP
vmaxSuc-P=1.005E-05*exp(-t/3060); % [mol/(min g)]
vmaxSuc-H=5.181E-06*exp(-t/3060); % [mol/(min g)]
KMSac=5.044E-05; % [mol/L]
KMP=2.336E-18; % [mol/L]
%Parameter der LP
vmaxLam=2.324E-05*exp(-t/3060); % [mol/(min g)]
vmaxLam3=1.02401E-06*exp(-t/3060); % [mol/(min g)]
KI1=1.159; % [mol/L]
KIG1P=0.357; % [mol/L]
KIGlc=0.048; % [mol/L]
KMG1P=2.771E-07; % [mol/L]
KMGlC=7.091E-03; % [mol/L]
KMLam=1.286E-03; % [mol/L]
% Definition der Ausgabematrix
S=y(1); G=y(2); F=y(3); L=y(4); G1P=y(5); P=y(6); L3=y(7);
% Definition der Reaktionen
dydt(1) = -(SP/V)*((vmaxSuc*Suc*P)/((KMSuc*P)+(KMP*Suc)+Suc+P));
dydt(2)=(SP/V)*((vmaxGlc*G1P)/(G1P+KMG1P+(KMG1P*Suc/KISuc)))-
(LP/V)*((vmaxLam2*G1P*Glc)/(KIG1P*KMGlc+(KMG1P+((KIG1P*KMGlc)/KI1))*Glc+(KMGlC*G1P)+G1
P*Glc+(KMG1P/KI1)*Glc^2));
dydt(3)=(SP/V)*((vmaxSuc*Suc*P)/((KMSuc*P)+(KMP*Suc)+Suc+P));
dydt(4)=
(LP/V)*((vmaxLam2*G1P*Glc)/(KIG1P*KMGlc+(KMG1P+((KIG1P*KMGlc)/KI1))*Glc+(KMGlC*G1P)+G1
P*Glc+(KMG1P/KI1)*Glc^2));
dydt(5)=-(SP/V)*((vmaxSuc*Suc*P)/((KMSuc*P)+(KMP*Suc)+Suc+P))+
(LP/V)*((vmaxLam2*G1P*Glc)/(KIG1P*KMGlc+(KMG1P+((KIG1P*KMGlc)/KI1))*Glc+(KMGlC*G1P)+G1
P*Glc+(KMG1P/KI1)*Glc^2))+ (SP/V)*((vmaxGlc*G1P)/(G1P+KMG1P+(KMG1P*Suc/KISuc)));
dydt(6)=(SP/V)*((vmaxSuc*Suc*P)/((KMSuc*P)+(KMP*Suc)+Suc+P))-
(LP/V)*((vmaxLam2*G1P*Glc)/(KIG1P*KMGlc+(KMG1P+((KIG1P*KMGlc)/KI1))*Glc+(KMGlC*G1P)+G1
P*Glc+(KMG1P/KI1)*Glc^2))- (SP/V)*((vmaxGlc*G1P)/(G1P+KMG1P+(KMG1P*Suc/KISuc)));
dydt=dydt'
; end
```

### 9.2.2 Skript zur Modellierung eines Batch-Versuchverlaufs

% Programm zur Darstellung der Konzentrationsverläufe eines Batch-Prozesses

% mithilfe des aufgestellten Modells

clear all;

global lp gi sp

% eingesetzte Mengen des jeweiligen Enzyms [g]

LP=0.3776;

SP=0.1447;

% Konzentrationen zum Zeitpunkt t=0 [mol/L]

S0=0.2;

G0=0.014;

F0=0.0;

L0=0;

G1P0=0.0;

P0=0.05;

L30=0;

% Integrationsbereich [min]

tspan=[0 1370];

% Definition des Anfangswertproblems

y0(1)=S0; y0(2)=G0; y0(3)=F0; y0(4)=L0; y0(5)=G1P0; y0(6)=P0; y0(7)=L30;

[t,y]=ode45('Func\_programBSTR',tspan,y0);

% Graphische Darstellung

plot(t,y(:,2),t,y(:,3),t,y(:,4),t,y(:,5),t,y(:,1),t,y(:,6),t,y(:,7));

ylim([0 0.2]);

xlabel('Zeit [min]'); ylabel('Konzentration [mol/L]');

legend('Glc','Fru','Lam','G1P','Suc','P','Lam3','location','Northeast');

### 9.2.3 Skript zur Optimierung der Suc-Konzentration und SP-Menge

clear all;

hold on

SPvar=[0.0:0.004:0.2];

sucvar=[0:0.004:0.2];

z=zeros(51);

for i=1:51

for j=1:51

global S0 SP LP

SP=spvar(i);

LP=0.1;

S0=sucvar(j);

G0=0.01;

F0=0.0;

L0=0;

G1P0=0;

P0=0.05;

L30=0;

```

tspan=[0 5000];
y0(1)=S0; y0(2)=G0; y0(3)=F0; y0(4)=L0; y0(5)=G1P0; y0(6)=P0; y0(7)=L30;
[t,y]=ode45('Func_programBSTR',tspan,y0);
z(i,j)=((1000*y(length(t),7)));
end

```

#### 9.2.4 Skript zur Optimierung des Enzymverhältnisses

```

clear all;
hold on
LPvar=[0.0:0.004:0.2];
SPvar=[0.0:0.002:0.1];
z=zeros(11);
for i=1:51
for j=1:51
global SP LP
LP=lpvar(i);
SP=spvar(j);
S0=0.05;
F0=0.0;
L0=0;
G0=0.0;
G1P0=0;
P0=0.05;
L30=0;
tspan=[0 5000];
y0(1)=S0; y0(2)=G0; y0(3)=F0; y0(4)=L0; y0(5)=G1P0; y0(6)=P0; y0(7)=L30;
[t,y]=ode45('Func_programBSTR',tspan,y0);
z(i,j)=((1000*y(length(t),7)));
end

```

#### 9.2.5 Skript zur Optimierung der Glc-Konzentration

```

clear all;
hold on
glcvar=[0:0.001:0.05];
for j=1:51
global G0 SP LP
LP=0.1;
SP=0.01;
G0=glcvar(j);
S0=0.05;
F0=0.0;
L0=0;
G1P0=0;
P0=0.05;
L30=0;
tspan=[0 5000];

```

```

y0(1)=S0; y0(2)=G0; y0(3)=F0; y0(4)=L0; y0(5)=G1P0; y0(6)=P0; y0(7)=L30;
[t,y]=ode45('Func_programBSTR',tspan,y0);
z(j)=((1000*y(length(t),7)));
end

```

### 9.3 ANOVA der LP-Hybridimmobilisate

**Tabelle A 4** Varianzanalyse (ANOVA) der Modelle 2ter Ordnung (Antwortvariablen  $Y_1$  Laminaribioseproduktion an Tag 1;  $Y_2$  Laminaribioseproduktion an Tag 4;  $Y_3$  Laminaribioseproduktion an Tag 7;  $Y_4$  Laminaritrioseproduktion an Tag 1;  $Y_5$  Laminaritrioseproduktion an Tag 4;  $Y_6$  Laminaritrioseproduktion an Tag 7) aus den Versuchsplänen zur Untersuchung der Einflüsse des pH-Wertes und der Molarität des Puffers sowie der Temperatur auf die Laminaribiose und Laminaritriosebildung durch die LP-Hybridimmobilisate.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	P-value Prob > F	
Y <sub>1</sub> Laminaribioseproduktion an Tag 1						
Modell	152,19	7	21,74	88,32	< 0,0001	signifikant
A-pH	0,03	1	0,03	0,12	0,7345	
B-Temperatur	117,63	1	117,63	477,85	< 0,0001	
C-Molarität	26,04	1	26,04	105,77	< 0,0001	
AB	0,06	1	0,06	0,25	0,6266	
AC	0,50	1	0,50	2,05	0,1863	
BC	3,70	1	3,70	15,02	0,0038	
A <sup>2</sup>	4,22	1	4,22	17,16	0,0025	
Residual	2,22	9	0,25			
Lack of Fit	2,13	7	0,30	7,02	0,1303	nicht signifikant
Pure Error	0,09	2	0,04			
Cor Total	154,41	16				
Standard deviation	0,5					
Mean	8,23					
C.V. %	6,03					
R <sup>2</sup>	0,9857					
Adj R <sup>2</sup>	0,9745					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9168					
Adeq precision	30,591					
Y <sub>2</sub> Laminaribioseproduktion an Tag 4						
Modell	130,42	9	14,49	68,92	< 0,0001	signifikant
A-pH	0,53	1	0,53	2,50	0,1578	
B-Temperatur	24,85	1	24,85	118,19	< 0,0001	
C-Molarität	8,30	1	8,30	39,50	0,0004	
AB	0,023	1	0,023	0,11	0,749	
AC	0,68	1	0,68	3,23	0,1155	
BC	1,68	1	1,68	7,97	0,0257	
A <sup>2</sup>	1,79	1	1,79	8,49	0,0225	
B <sup>2</sup>	53,08	1	53,08	252,44	< 0,0001	
C <sup>2</sup>	0,17	1	0,17	0,81	0,3992	
Residual	1,47	7	0,21			

Lack of Fit	0,8	5	0,16	0,47	0,7854	nicht signifikant
Standard deviation	0,46					
Mean	5,84					
C.V. %	7,85					
R <sup>2</sup>	0,9888					
Adj R <sup>2</sup>	0,9745					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9391					
Adeq precision	24,668					
Y <sub>3</sub> Laminaribioseproduktion an Tag 7						
Modell	101,26	9	11,25	60,12	< 0,0001	signifikant
A-pH	0,73	1	0,73	3,89	0,0892	
B-Temperatur	41,79	1	41,79	223,29	< 0,0001	
C-Molarität	11,10	1	11,10	59,31	0,0001	
AB	0,52	1	0,52	2,76	0,1407	
AC	0,02	1	0,02	0,11	0,7478	
BC	2,68	1	2,68	14,34	0,0068	
A <sup>2</sup>	2,18	1	2,18	11,64	0,0113	
B <sup>2</sup>	22,03	1	22,03	117,70	< 0,0001	
C <sup>2</sup>	0,17	1	0,17	0,90	0,3755	
Residual	1,31	7	0,19			
Lack of Fit	0,64	5	0,13	0,38	0,8335	nicht signifikant
Standard deviation	0,43					
Mean	4,47					
C.V. %	9,68					
R <sup>2</sup>	0,9872					
Adj R <sup>2</sup>	0,9708					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9370					
Adeq precision	23,551					
Y <sub>4</sub> Laminaritrioseproduktion an Tag 1						
Modell	0,056	5	0,011	25,70	< 0,0001	signifikant
A-pH	2,770E-004	1	2,770E-004	0,64	0,4405	
B-Temperatur	0,029	1	0,029	66,17	< 0,0001	
C-Molarität	0,014	1	0,014	33,18	0,0001	
BC	2,585E-003	1	2,585E-003	5,98	0,0325	
A <sup>2</sup>	9,748E-003	1	9,748E-003	22,54	0,0006	
Residual	4,757E-003	11	4,324E-004			
Lack of Fit	4,638E-003	9	5,154E-004	8,70	0,1073	nicht signifikant
Pure Error	1,185E-004	2	5,926E-005			
Cor Total	0,060	16				

Standard deviation	0,021					
Mean	0,12					
C.V. %	17,00					
R <sup>2</sup>	0,9212					
Adj R <sup>2</sup>	0,8853					
Pred. R <sup>2</sup>	0,8065					
Adeq precision	15,644					
Y <sub>5</sub> Laminaritrioseproduktion an Tag 4						
Modell	0,40	8	0,050	73,42	< 0,0001	signifikant
A-pH	0,011	1	0,011	15,64	0,0042	
B-T	0,21	1	0,21	307,91	< 0,0001	
C-M	0,089	1	0,089	129,70	< 0,0001	
AC	1,138E-003	1	1,138E-003	1,66	0,2330	
BC	0,044	1	0,044	64,73	< 0,0001	
A <sup>2</sup>	5,838E-003	1	5,838E-003	8,54	0,0192	
B <sup>2</sup>	0,024	1	0,024	35,02	0,0004	
C <sup>2</sup>	4,995E-003	1	4,995E-003	7,31	0,0269	
Residual	5,467E-003	8	6,833E-004			
Lack of Fit	4,716E-003	6	7,860E-004	2,09	0,3579	nicht signifikant
Standard deviation	0,026					
Mean	0,20					
C.V. %	12,81					
R <sup>2</sup>	0,9866					
Adj R <sup>2</sup>	0,9731					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9297					
Adeq precision	28,589					
Y <sub>6</sub> Laminaritrioseproduktion an Tag 7						
Modell	0,42	8	0,052	82,35	< 0.0001	0,42
A-pH	9,510E-003	1	9,510E-003	14,92	0,0048	9,510E-003
B-T	0,20	1	0,20	316,40	< 0.0001	0,20
C-M	0,096	1	0,096	150,83	< 0.0001	0,096
AB	7,441E-003	1	7,441E-003	11,67	0,0091	
BC	0,079	1	0,079	124,18	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	0,014	1	0,014	21,25	0,0017	
B <sup>2</sup>	3,169E-003	1	3,169E-003	4,97	0,0563	
C <sup>2</sup>	2,710E-003	1	2,710E-003	4,25	0,0732	
Residual	5,100E-003	8	6,374E-004			



Lack of Fit	2,970E-003	6	4,950E-004	0,46	0,8025	nicht signifikant
Standard deviation	0,025					
Mean	0,16					
C.V. %	15,35					
R <sup>2</sup>	0,9880					
Adj R <sup>2</sup>	0,9760					
Pred. R <sup>2</sup>	0,9543					
Adeq precision	29,649					